



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

SANDRA CRISTINA HEIM LONIEN

**INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi*-CÉLULAS DO SANGUE
HUMANO ENRIQUECIDAS COM CÉLULAS DENDRÍTICAS:
RELAÇÃO DA VIA CICLOOXIGENASE E INFECÇÃO**

SANDRA CRISTINA HEIM LONIEN

**INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi*-CÉLULAS DO SANGUE
HUMANO ENRIQUECIDAS COM CÉLULAS DENDRÍTICAS:
RELAÇÃO DA VIA CICLOOXIGENASE E INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Doutora em Patologia Experimental.

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

Londrina
2017

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

Lonien, Sandra Cristina Heim.

Interação *Trypanosoma cruzi*-células do sangue humano enriquecidas com células dendríticas : Relação da via ciclooxigenase e infecção / Sandra Cristina Heim Lonien. - Londrina, 2017.

104 f. : il.

Orientador: Phileno Pinge Filho.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* - Tese. 2. Células dendríticas - Tese. 3. Aspirina - Tese. 4. Celecoxibe - Tese. I. Pinge Filho, Phileno . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

SANDRA CRISTINA HEIM LONIEN

**INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi*-CÉLULAS DO SANGUE HUMANO
ENRIQUECIDAS COM CÉLULAS DENDRÍTICAS: RELAÇÃO DA VIA
CICLOOXIGENASE E INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutora em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dr^a. Andressa de Freitas Mendes Dionísio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Graziela Sciantti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de setembro de 2017.

Dedico este trabalho ao meu esposo
Geraldo e aos meus filhos Thiago e
Ricardo, que tanto se sacrificaram para
que eu pudesse concluir esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof Dr Phileo Pinge Filho pela oportunidade e confiança a mim depositada, pela compreensão, pelo incentivo e dedicação.

Ao meu co-orientador Dr Juliano Bordignon agradeço pelos ensinamentos sobre células dendríticas, pelo incentivo e carinho e pela enorme colaboração neste trabalho.

À todos os doadores voluntários, cuja colaboração foi essencial para a execução deste trabalho.

Ao Dr Guilherme Ferreira pelos ensinamentos sobre citometria de fluxo e pelas contribuições na realização deste trabalho.

À Dra Priscylla Fanini Wowk pelo apoio e pelas contribuições neste trabalho.

À Dra Aparecida Donizeti Malvezi pela ajuda valiosa nas leituras das lâminas dos ensaios de invasão.

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia Experimental, agradeço a todos sem exceção.

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Temos de fazer o melhor que podemos. Esta
é a nossa sagrada responsabilidade humana.”
Albert Einstein

LONIEN, Sandra Cristina Heim. **Interação *Trypanosoma cruzi*-células do sangue humano enriquecidas com células dendríticas**: relação da via ciclooxigenase e infecção. 2017. 104 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina, estão infectadas com *Trypanosoma cruzi*, o parasita que causa a doença de Chagas. Suspeita-se que as cepas virulentas de *T. cruzi* aproveitam as células dendríticas (DCs) para superar a resposta imune do hospedeiro e instalar, com sucesso, a infecção. Embora as DCs sejam caracterizadas por uma enorme diversidade funcional, não foi analisada a participação da ciclooxigenase (COX) e do adenosina monofosfato cíclico (cAMP) na interação DCs-*T. cruzi*. Em um trabalho desenvolvido anteriormente em nosso laboratório, foi descrito que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como a aspirina e o celecoxibe inibem a invasão de *T. cruzi* em células cardíacas de ratos e promovem a modulação da resposta inflamatória. Explorando este mecanismo, populações de células mononucleares de sangue periférico humano enriquecidas com DC (DC-PBMCs) foram utilizadas como nosso modelo. Nossos resultados mostraram que o tratamento de DC-PBMCs com celecoxibe (CEL), um inibidor seletivo de ciclooxigenase-2 ou SQ 22,536, inibidor da adenilato ciclase, inibiu a infecção por *T. cruzi*. Nenhum efeito foi observado quando as células foram tratadas com aspirina (ASA, um inibidor não seletivo de COX-1 e COX-2) bem como foi independente da produção de óxido nítrico (NO). A expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 foram semelhantes em DC-PBMCs tratadas ou não com ambos os inibidores de COX. A infecção não estimulou a secreção de TNF- α mas aumentou a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e NO pelas DC-PBMCs infectadas. O tratamento com ASA ou CEL não afetou a produção de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e NO pelas DC-PBMCs infectadas, mas aumentou a produção de IL-1 β . Nossos resultados reforçam a ideia de que a COX-2 desempenha um papel fundamental no processo de invasão do *T. cruzi*, na resposta inflamatória inata e podem representar um alvo pertinente para o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Citocinas. Células dendríticas. Aspirina. Celecoxibe.

LONIEN, Sandra Cristina Heim. **Interaction *Trypanosoma cruzi*- human blood cells enriched with dendritic cells:** relationship of the via ciclooxigenase and infection. 2017. 104 p. Thesis (PhD in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

About 6 to 7 million people worldwide, mostly in Latin America, are estimated to be infected with *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes Chagas' disease. It seems that *T. cruzi* virulent strains take advantage of susceptible dendritic cells (DCs) to overcome host immune response and successfully install the infection. Although DCs are characterized by a great functional diversity, the participation of cyclooxygenase (COX) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the DC-*T. cruzi* interaction was not analyzed. In a study previously developed in our laboratory, it was described that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as aspirin and celecoxib inhibit the invasion of *T. cruzi* in cardiac cells of rats and promote the modulation of the inflammatory response. Exploring this mechanism, human DC-enriched peripheral blood mononuclear cells populations (DC-PBMC) were used as our model. Our results showed that treatment of DC-PBMC with celecoxib (CEL), a selective cyclooxygenase-2 inhibitor or SQ 22,536, adenylate cyclase inhibitor, inhibited *T. cruzi* infection. No effect was observed when the cells were treated with aspirin (ASA, a non-selective inhibitor of COX-1 and COX-2) as well as independent of nitric oxide (NO) production. Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were similar in DC-PBMC treated with or not with both COX inhibitors. The infection did not stimulate TNF- α secretion but increased the production of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and NO by the infected DC-PBMC. Treatment with ASA or CEL did not affect the production of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and NO by infected DC-PBMC, but increased IL-1 β production. Our results reinforce the idea that COX-2 plays a fundamental role in the invasion of *T. cruzi* in the innate inflammatory response and may represent a relevant target for the development of new treatments for Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Cytokines. Dendritic cells. Aspirin. Celecoxib.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapa epidemiológico da doença de Chagas	12
Figura 2 –	Esquema do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 3 –	Modelos de invasão do <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Via dependente de lisossomo; (B) via dependente de actina; (C) via independente de lisossomo.	19
Figura 4 –	Subtipos de células dendríticas murinas e humanas e seus marcadores fenotípicos.....	29
Figura 5 –	Metabolismo dos eicosanoides	38
Figura 6 –	A cascata do ácido araquidônico – via da ciclooxigenase	40
Figura 7 –	Sítio ativo da ciclooxigenase. EE = espaço extra. BL = bolsa lateral.	42
Figura 8 –	Esquema da ação da aspirina sobre a ciclooxigenase	45
Figura 9 –	Estrutura química da aspirina (esquerda) e do celecoxibe (direita).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
ALX	Receptor da lipoxina
AMPc	Adenosina-3'-5' monofosfato ou AMP cíclico
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASA	Aspirina ou ácido acetilsalicílico
ATLs	Lipoxinas desencadeadas pela aspirina
CDs	Células dendríticas
CD11c	Marcador de superfície celular das células dendríticas
CD14	Marcador de superfície celular de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos
CD80	Molécula co-estimuladora ou B7.1, presente em monócitos e células dendríticas
CD86	Molécula co-estimuladora ou B7.2, presente em monócitos e células dendríticas
CEL	Celecoxibe
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase do tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
CREB	Proteína ligada ao elemento de resposta do AMPc
CVC	Complexo vacúolo contrátil
DAG	Diacilglicerol
DCs	Células dendríticas
DC-PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico humano enriquecidas com células dendríticas
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i> . Conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns
EPAC	Proteína ativada por AMPc
FSK	Forskolina
GP	Glicoproteína

GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetraenóico
HPETE	Ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina do tipo 1
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
LO	Lipoxigenase
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MdDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
MHC I	Complexo de histocompatibilidade principal de classe 1
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal de classe 2
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células assassinas naturais
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NSAIDs	Drogas anti-inflamatórias não esteroidais
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógeno
PDE	Fosfodiesterase
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina da classe E ₂
PGHS	Prostaglandina endoperoxídeo sintase ou ciclooxigenase
PGI	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase classe I
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
POP	Prolil oligopeptidase
SQ22,536	(9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purina-6-amina
Syt VII	Sinaptotagmina VII

Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcAC	Adenilato ciclase tripanosomatida
TcTOX	Hemolisina tripanosomatida
TM	Tripomastigotas
TMC	Tripomastigotas de cultura
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento beta
Th1	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 1
Th2	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 2
TLR	Receptor do tipo toll
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TS	Trans-sialidase
TXA ₂	Tromboxana A ₂
VP	Vacúolo parasitóforo
WT	Linhagem selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	12
1.1.1	Epidemiologia.....	12
1.1.2	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.1.3	Aspectos clínicos da doença de Chagas.....	16
1.2	A INVASÃO DA CÉLULA DO HOSPEDEIRO É UM EVENTO CRÍTICO NO ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2.1	Infecção em células que não fazem fagocitose.....	18
1.2.2	Infecção de células fagocíticas.....	25
1.3	CÉLULAS DENDRÍTICAS E <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
1.3.1	Aspectos gerais das células dendríticas.....	26
1.3.2	Células dendríticas murinas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
1.3.3	Células dendríticas humanas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
1.4	EICOSANOIDES.....	38
1.4.1	Via da ciclooxygenase e receptores prostanoides.....	39
1.4.1.1	Enzima ciclooxygenase.....	41
1.4.2	PGE ₂ e DCs.....	42
1.5	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS.....	44
1.5.1	Aspirina.....	44
1.5.2	Celecoxibe.....	46
1.6	EICOSANOIDES E <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
1.6.1	Aspirina e células dendríticas.....	50
1.7	ADENILATO CICLASE.....	51
1.7.1	AMPc e células dendríticas.....	53
1.7.2	AMPc e <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
2	JUSTIFICATIVA	55
3	OBJETIVOS	56
3.1	OBJETIVO GERAL.....	56
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56

ARTIGO CIENTÍFICO	57
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	99
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....	100
ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – Projeto 2012.....	101
ANEXO C - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – Projeto 2014.....	102
ANEXO D - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – Manutenção do <i>Trypanossoma cruzi</i> 2015	103
ANEXO E - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - Manutenção do <i>Trypanossoma cruzi</i> 2017	104

1 INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

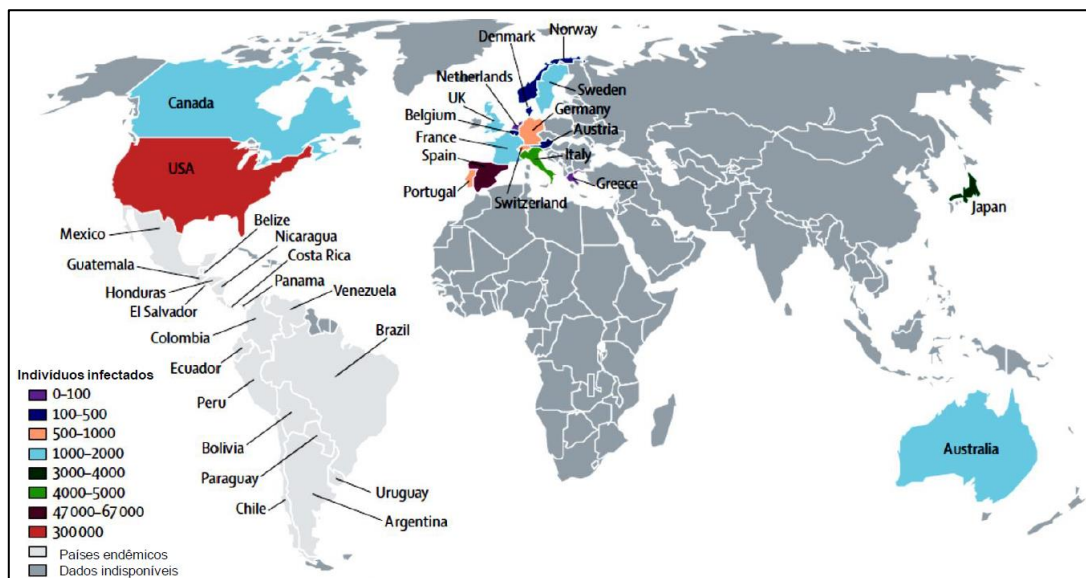
1.1.1. Epidemiologia

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

Estima-se que entre seis e sete milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas e 25 milhões em situação de risco em 21 países da América Latina (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; THE LANCET EDITORIAL, 2006; WHO, 2017).

Atualmente, devido às migrações internacionais, a Doença de Chagas pode ser encontrada no Canadá, Estados Unidos, em vários países da Europa, no Japão e na Austrália (figura 1) (CONNERS et al., 2016; SCHMUNIS; YADON, 2010). Estima-se que mais de trezentos mil indivíduos infectados vivam nos Estados Unidos, sendo a maioria composta de imigrantes provenientes do México e da América Central (BERN; MONTGOMERY, 2009; CHIN; ARABOV; MANDEL, 2013; CONNERS et al., 2016).

Figura 1. Mapa epidemiológico da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de RASSI; RASSI; MARIN-NETO (2010).

A doença é transmitida pelas fezes eliminadas durante a picada de insetos vetores contaminados da família Reduviidae, especialmente das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, conhecidos popularmente como barbeiros, devido à preferência pela região do rosto onde costumam sugar sangue (GALVÃO, 2014). Pode ocorrer também a transmissão por transfusão de sangue ou transplacentária, produzindo os casos de infecção congênita (JORGE; CASTRO, 2000).

Em 2006 o Brasil obteve a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas por *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde e atualmente a transmissão oral tem sido destaque no país, principalmente na Amazônia Legal (FERREIRA; SILVA, 2006).

Durante os anos 2000-2011 foram notificados mais de 1.200 casos agudos da Doença de Chagas em 138 surtos, sendo 776 (71%) atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas contaminados com *T. cruzi*, entre eles açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e o palmito de babaçu (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A doença de Chagas também é importante devido ao seu impacto econômico. A mortalidade precoce e a incapacidade causadas por esta doença, que muitas vezes ocorre na população mais produtiva (adultos jovens), resulta em uma perda econômica significativa. As complicações cardíacas e digestivas frequentemente levam à necessidade de tratamento e procedimentos cirúrgicos de longo prazo, incluindo marcapasso e implantação de desfibrilador cardíaco e transplante cardíaco, aumentando ainda mais os custos relacionados à doença (FRANCO-PAREDES, et al., 2007; LEE, et al., 2013).

Nos países latino-americanos, a doença se enquadra no grupo das doenças tropicais negligenciadas, ou seja, doenças associadas à pobreza e negligenciadas pelos órgãos de comunicação, sociais e políticos com um impacto adverso importante na saúde, bem-estar e desenvolvimento socioeconômico em países de baixa renda e em desenvolvimento (MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007). Vários estudos têm demonstrado as vantagens econômicas da prevenção da doença através de programas de controle de vetores (CASTILLO-RIQUELME et al., 2008; MONCAYO; SILVEIRA, 2009), uma estratégia que se mostrou eficaz em iniciativas colaborativas internacionais na América Latina (ABUHAB et al., 2013; MONCAYO; SILVEIRA, 2009)

Segundo dados da organização *Drugs For Neglected Diseases initiative* (DNDi), a doença de Chagas, sozinha, é responsável, por cerca de 12 mil mortes por ano na região da América Latina. E representa um custo global de US\$ 7,2 bilhões por ano. O Brasil está no topo do ranking em perdas de produtividade com um custo de US\$ 129 milhões para a saúde pública por ano (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2013).

À medida que a doença se expande para além da América Latina, há uma preocupação crescente com relação à sua carga econômica global. Um estudo recente estima os custos globais de US\$ 7,19 bilhões/ano, superando muitas doenças proeminentes globalmente, como câncer cervical e rotavirose (LEE et al., 2013). Mais de 10% destes custos emanam dos Estados Unidos e Canadá, onde a doença não é endêmica e não é reconhecida como um problema de saúde significativo (MATHERS, EZZATI e LOPEZ, 2007; MONCAYO e SILVEIRA, 2009; SCHOFIELD; DIAS, 1991).

1.1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

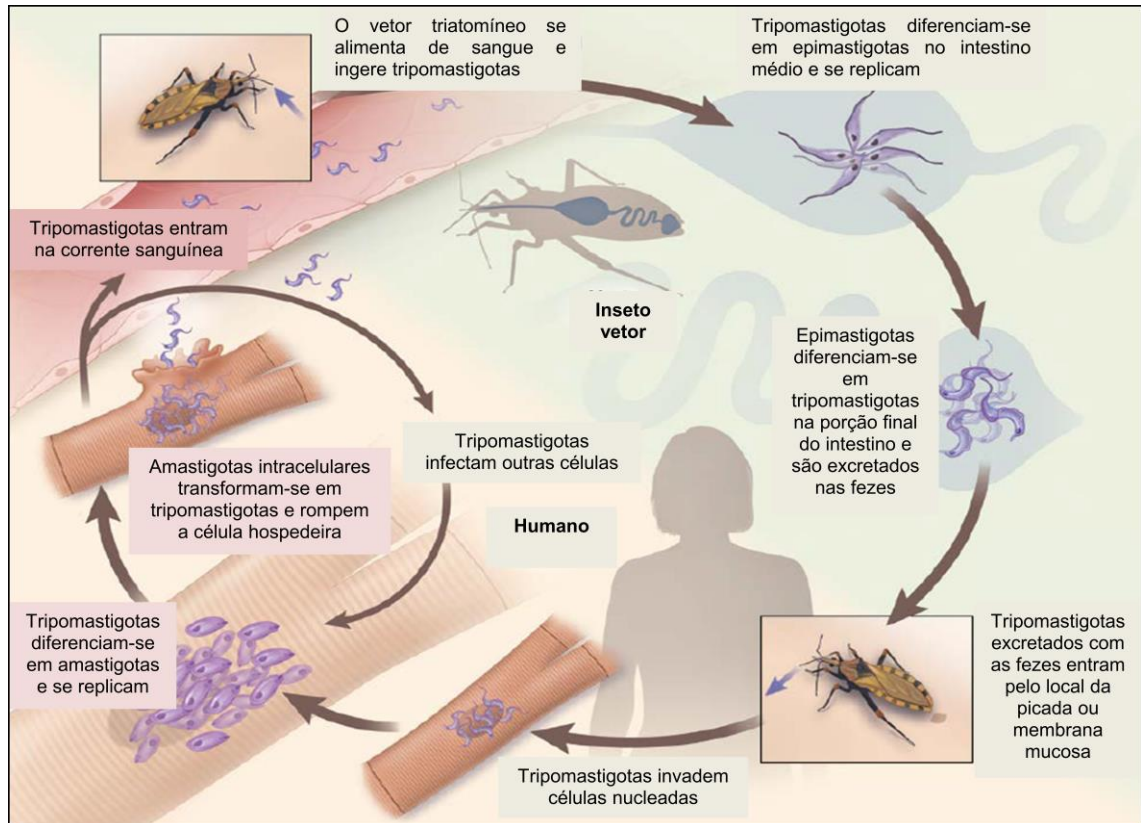
T. cruzi exibe diferentes formas durante seu ciclo de vida encontradas em dois hospedeiros - um inseto vetor e um mamífero (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010).

As formas evolutivas do *T. cruzi* são reconhecidas por apresentarem forma esférica, piriforme ou alongada e pela posição relativa do núcleo e cinetoplasto e da posição do flagelo em relação à bolsa flagelar. São elas epimastigota, tripomastigota, amastigota e esferomastigota, sendo essa última encontrada no estômago do inseto vetor e em determinadas situações experimentais *in vitro* (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (figura 2) inicia-se quando o vetor triatomíneo ingere formas tripomastigotas circulantes no sangue de um hospedeiro mamífero. As formas tripomastigotas sanguíneas diferenciam-se em formas epimastigotas no intestino médio, a forma replicativa no hospedeiro invertebrado. As formas epimastigotas migram para a porção final do intestino e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos infectantes, os quais são excretados nas fezes do inseto vetor. Os tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro mamífero através da solução de continuidade na pele criada pela picada do inseto ou através

de membranas mucosas intactas e invadem as células nucleadas (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 2. Esquema do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de BERN (2015).

No interior do citoplasma dessas células, os tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, as quais replicam-se a cada 12 horas no período de 4 a 5 dias. Ao final desse período, os amastigotas transformam-se novamente em tripomastigotas, rompem as células, invadem tecidos adjacentes e espalham-se através dos vasos linfáticos e sanguíneos e chegam a tecidos distantes, invadindo outras células, principalmente células musculares (cardíacas, lisas ou esqueléticas) e ganglionares, e iniciam um novo ciclo replicativo ou podem ser ingeridos pelo inseto vetor quando este se alimentar no hospedeiro mamífero (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

1.1.3 Aspectos clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas ocorre em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda inicia-se com a entrada do parasito no hospedeiro humano. O período de incubação dura de 1 a 2 semanas na transmissão vetorial ou de 20 a 40 dias na transmissão por transfusão sanguínea. Os sintomas normalmente são inespecíficos, como febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose, o que dificulta o diagnóstico nessa fase. Raramente surgem manifestações no local da entrada do parasito, mas quando presentes podem surgir o chagoma de inoculação (nódulo na pele) ou o sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral), quando a entrada é na mucosa ocular. Outra característica dessa fase é o grande número de parasitas circulantes no sangue (alta parasitemia). Quando ocorre morte nessa fase, o que é raro, dá-se pela miocardite grave e falência cardíaca (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Os pacientes que sobrevivem à fase aguda desenvolvem uma resposta imune mediada por células que controla a replicação do parasito (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). A fase crônica da infecção inicia-se e muitos pacientes permanecem assintomáticos por toda a vida, a chamada forma indeterminada da doença. Estima-se que 20 a 30% das pessoas infectadas apresentarão progressão no curso de décadas para a cardiopatia chagásica crônica e 10% para a forma digestiva, neurológica ou alterações mistas (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; WHO, 2017). No Brasil, a cardiopatia chagásica crônica é uma importante causa de morte entre adultos de 30 a 60 anos e uma grande causa de implante de marcapasso e transplante cardíacos (FIOCRUZ, 2013).

A forma indeterminada da doença é definida pela presença de infecção confirmada por testes parasitológicos e sorológicos, eletrocardiograma normal, exames radiológicos do pulmão, esôfago e cólon normais e ausência de sintomas clínicos (RIBEIRO; ROCHA, 1998; MARIN-NETO et al., 2002). A maioria das pessoas em áreas endêmicas encontra-se nesse estágio da doença e aproximadamente 40% desses pacientes podem persistir por anos nessa situação clínica (DIAS, 1989; NUNES et al., 2013).

A forma cardíaca ou cardiomiopatia chagásica caracteriza-se pela miocardite crônica que envolve toda a parede cardíaca e o sistema de condução (MARIN-NETO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012). As alterações no sistema de condução levam à bradiarritmias e taquiarritmias, aneurisma apical, insuficiência cardíaca,

tromboembolismo e morte súbita. A combinação de bloqueio do ramo direito e bloqueio fascicular anterior esquerdo é típica na cardiomiopatia chagásica (ANDRADE et al., 2011; MAGUIRE et al., 1987; NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013).

Tais alterações são decorrentes da persistência do parasito no tecido cardíaco (BENVENUTI et al., 2008), baixa parasitemia e lesão miocárdica mediada pelo sistema imune (COSSIO et al., 1976; DUTRA et al., 1994; HIGUCHI et al., 1997), a qual contribui para o dano autonômico (AMORIM et al., 1968; KÖBERLE, 1968; OLIVEIRA, 1985; RIBEIRO et al., 2005) e distúrbios microvasculares (BENVENUTI et al., 2008; FERRANS et al., 1988; HIGUCHI et al., 1999).

As abordagens terapêuticas para o manejo da cardiomiopatia chagásica seguem as mesmas recomendações padrão para o tratamento da insuficiência cardíaca não chagásica. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina e os betabloqueadores são as principais drogas utilizadas (BOTONI et al., 2007). Embora os betabloqueadores tenham sido evitados em pacientes com doença de Chagas, devido a bradiarritmias, alguns estudos demonstraram que a terapia com betabloqueadores é segura e foi associada com melhor sobrevida (BOTONI et al., 2007; ISSA et al., 2010). Seus efeitos sobre o sistema adrenérgico parecem ser uma estratégia atraente para prevenir a morte cardíaca súbita (BESTETTI et al., 2008; BESTETTI et al., 2011).

O transplante cardíaco é o tratamento de escolha para pacientes com insuficiência cardíaca avançada, incluindo aqueles dependentes de drogas inotrópicas e/ou suporte circulatório (ANDRADE et al., 2011; BESTETTI et al., 2008). Uma grande preocupação no receptor de transplante cardíaco é a consequência da terapia imunossupressora de longo prazo após o transplante que acarreta o risco de reativação da infecção por *T. cruzi* (FIORELLI et al., 2011). Como consequência da persistente escassez de órgãos de doadores, tem havido um interesse crescente por estratégias alternativas, em particular no suporte circulatório mecânico. Os dispositivos de assistência ventricular esquerda têm sido utilizados em alguns pacientes, geralmente como uma ponte para o transplante (BOCCHI; FIORELLI; 2001; FIORELLI et al., 2011; SCHMID et al., 2005).

A forma digestiva predominantemente afeta o esôfago, o cólon ou ambos e resulta da lesão aos neurônios intramurais (DE OLIVEIRA et al., 1998; PINAZO et al., 2010). As manifestações da doença esofágica vão desde distúrbios de

motilidade assintomáticas e acalasia leve até megaesôfago grave, com sintomas que incluem disfagia, odinofagia, refluxo esofágico, perda de peso, aspiração, tosse e regurgitação. Os sintomas esofágicos podem ser tratados por drogas que promovem o relaxamento do esfíncter ou por miotomia laparoscópica. O megacólon é caracterizado por constipação prolongada que pode evoluir para fecaloma, vólculo e isquemia intestinal. Os estágios iniciais da doença colônica respondem a dietas ricas em fibras, laxantes ou enemas. Os estágios mais avançados do megaesôfago e do megacólon requerem ressecção cirúrgica (DE OLIVEIRA et al., 1998).

A forma cardiodigestiva é uma combinação de doença cardíaca com megaesôfago ou megacólon, ou ambos. Na maioria dos países, o desenvolvimento do megaesôfago geralmente antecede a doença cardíaca e do cólon, mas a prevalência exata da forma cardiodigestiva não é conhecida porque poucos estudos adequados foram feitos (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

1.2 A INVASÃO DA CÉLULA DO HOSPEDEIRO É UM EVENTO CRÍTICO NO ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Infecção em células que não fazem fagocitose

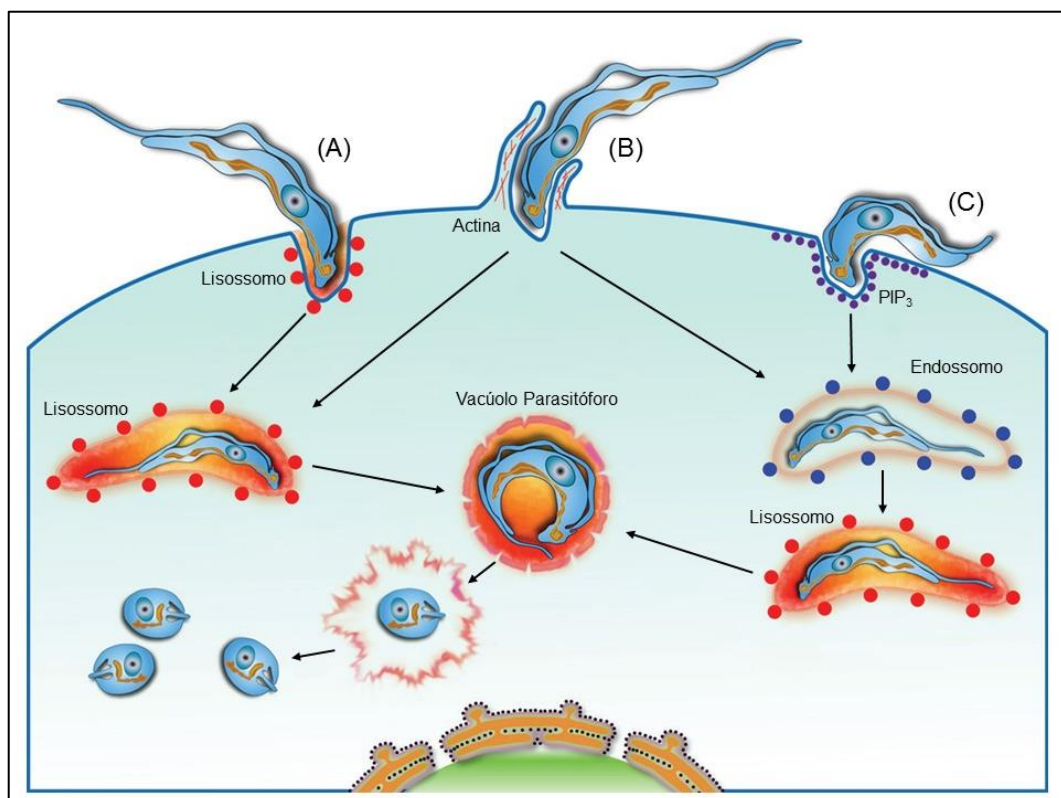
Nos mamíferos, o ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se com a penetração de tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes e urina do inseto vetor, através da pele lesada ou mucosa (GARCIA et al., 2007). A forma tripomastigota circula na corrente sanguínea e invade as células hospedeiras e, inicialmente, aloja-se no interior de um vacúolo endocítico, o vacúolo parasitóforo (DE CARVALHO; DE SOUZA, 1989). A exposição das formas tripomastigotas a este ambiente ácido é necessária à secreção e atividade da proteína TcTox, atuante na formação de poros na membrana vacuolar e, conseqüentemente, no escape para o citoplasma. O meio ácido parece, também, ter papel importante no início da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, forma intracelular proliferativa. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma.

Foram propostos três mecanismos distintos de entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira (figura 3). A via dependente de lisossomo (A) é iniciada pela exocitose de lisossomos Ca^{2+} -mediada. Na via dependente de actina (B), as formas

tripomastigotas (TM) penetram na célula através da expansão da membrana plasmática actina-mediada que culmina na formação do vacúolo endocítico. Na via independente de lisossomo (C), os parasitos entram na célula através de invaginações da membrana plasmática que acumulam fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), produto da ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), sendo internalizados em um vacúolo endossômico primário que posteriormente se funde como lisossomos. As três vias culminam na formação do vacúolo parasitóforo (revisado por DE SOUZA, DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; revisado por SIBLEY, 2011).

Após escapar do vacúolo, *T. cruzi* se diferencia na forma amastigota e permanece livre no citoplasma da célula hospedeira em estado quiescente por algumas horas e inicia, posteriormente, seu processo de replicação por fissão binária (figura 3). Em seguida, as formas amastigotas diferenciam-se, novamente, em tripomastigotas (revisado por DE SOUZA, DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; revisado por SIBLEY, 2011).

Figura 3. Modelos de invasão do *Trypanosoma cruzi*. (A) Via dependente de lisossomo; (B) via dependente de actina; (C) via independente de lisossomo.



Fonte: Adaptado de DE SOUZA, DE CARVALHO; BARRIAS (2010).

A intensa movimentação gerada pelos parasitos no interior da célula hospedeira promove sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação dos tripomastigotas no meio extracelular tornando-os capazes de infectar novas células. A ruptura da célula parasitada determina reação inflamatória focal, caracterizada pela presença de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, além de congestão e edema (ANDRADE, 2000; SOUZA, 2000). Assim sendo, constata-se que a invasão da célula do hospedeiro é um evento crítico no estabelecimento da infecção com *T. cruzi* (revisado por YOSHIDA, 2006; CAMPOS; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016).

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

Os diferentes mecanismos de invasão estão relacionados com o processo de adesão que envolve receptores e ligantes disponíveis tanto no parasito quanto na superfície de células-alvo específicas (CAMPOS; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016; MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012).

A adesão do parasito à superfície celular varia de acordo com a população do parasito, com a forma evolutiva e com a célula-alvo (ARAÚJO-JORGE; BARBOSA; MEIRELLES, 1992).

Diferentes tipos de carboidratos, presentes nas glicoproteínas e nos glicolipídeos da superfície do parasito e da célula hospedeira, parecem participar desse processo de adesão (CALVET et al., 2004; MEIRELLES et al., 1999). Glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* são importantes para mobilização do cálcio intracelular, tanto do parasito quanto da célula hospedeira, sendo este fenômeno de grande importância para o processo de interiorização do parasito (CAMPOS, MARTINS-TEIXEIRA e CARVALHO, 2016).

A maioria dos estudos realizados na tentativa de elucidar os mecanismos utilizados pelo protozoário *T. cruzi* utilizaram formas TM geradas em meio líquido ou a partir do cultivo celular (TMC) como sócias das formas encontradas no inseto vetor e no sangue, respectivamente. As análises dos dados da literatura permitem concluir que durante a entrada na célula do hospedeiro as formas TM e TMC utilizam

diferentes tipos de moléculas que induzem a transdução de sinal e mobilização de Ca^{2+} .

De acordo com Schenkman, Dias e Nussenzweig (1991) a adesão dos TM à superfície celular, mediada por receptores, está restrita a certas regiões da membrana. Ruiz e colaboradores (1998) descrevem que a capacidade dos tripomastigotas, de diferentes isolados de *T. cruzi*, de invadir as células hospedeiras é determinada pela expressão diferencial de glicoproteínas de superfície que exibem atividade sinalizadora de cálcio distinta. Três moléculas de superfície com atividade indutora de Ca^{2+} já foram identificadas, são elas: a gp82, gp30 e gp35/50.

O papel dessas moléculas durante o processo de invasão celular foi deduzido por meio de experimentos nos quais a internalização de TM foi inibida por meio da utilização de glicoproteínas recombinantes ou com o uso de anticorpos monoclonais (CAMPOS; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016; CORTEZ et al., 2003; RAMIREZ et al., 1993; RUIZ et al., 1993). Em adição, a análise de moléculas de superfície dos parasitos possibilitou sua divisão em dois grupos distintos quanto à capacidade de invasão, *in vitro*, de células de mamíferos (YOSHIDA, 2006).

As populações que apresentam maior capacidade infectante não possuem as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50. Tripomastigotas dos isolados mais infectivos, como o clone CL Brener, ligam-se à superfície da célula hospedeira através de gp82 e induzem a ativação de PTK (proteína tirosina quinase.). Essa sinalização também envolve a ativação da fosfolipase (PLC), a geração de IP3 (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) e, conseqüentemente, a mobilização de Ca^{2+} dos seus estoques intracelulares, provavelmente retículo endoplasmático (CORTEZ et al., 2014; YOSHIDA et al., 2000).

Por outro lado, em isolados de menor capacidade infectante, como a cepa G, a ligação à superfície celular ocorre principalmente através de gp35/50, que promove uma cascata de sinalização menos eficiente. Nesses isolados, a cascata de sinalização é independente de PTK e PLC e provavelmente dependente de AMPc (AMP cíclico). O Ca^{2+} necessário para invasão parece ser liberado para o citosol a partir de vacúolos contendo um sistema de troca iônica $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, também chamados acidocalciosomas (MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012; revisto em YOSHIDA, 2006).

O envolvimento das moléculas gp82, gp30 e gp35/50 na internalização de TM tem sido caracterizado em células de mamíferos que são fagócitos não

profissionais. Experimentos com diferentes isolados de *T. cruzi* mostraram que a taxa de infecção de macrófagos por TM correlaciona com aquela encontrada em células HeLa (SCHENKAMN; MORTARA, 1992).

Segundo Andrews (1995) a elevação dos níveis intracelulares de cálcio na célula hospedeira, promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. Os lisossomos são deslocados por uma proteína motora associada aos microtúbulos, a cinesina (RODRÍGUEZ et al., 1996; TARDIEUX et al., 1992).

Além disso, o processo de invasão é facilitado pela ruptura de microfilamentos de actina (TARDIEUX et al., 1992). A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} promove a fusão dos lisossomos com o plasmalema. A proteína sinaptotagmina VII, membro da família sinaptotagmina, está presente na superfície dos lisossomos de diferentes tipos celulares e possui um domínio de ligação ao Ca^{2+} , regulando esse processo (CALER et al. 2001; YOSHIDA, 2006).

Outras moléculas de superfície do parasito também participam do processo de invasão celular. Oligopeptidase B (Opb), uma serina endopeptidase expressa pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, é capaz de ativar uma cascata de sinalização de Ca^{2+} dependente de PLC e IP3 (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 1995). A cruzipaina, uma cisteína proteinase expressa em todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi* (PAIVA et al., 1998) também ativa cascatas de sinalização mobilizadoras de Ca^{2+} , aumentando assim a eficácia do processo de invasão celular. Já a trans-sialidase (TS) transfere ácidos siálicos (2,3)-ligados de glicoproteínas e glicolipídios da superfície da célula-alvo para a superfície do parasito (SCHENKMAN, et al., 1991).

O processo de sinalização é importante para início do processo de adesão e para formação de vacúolos parasitóforos (VP) eficientes. A presença do ácido siálico parece ser fundamental para correta justaposição das membranas do vacúolo nascente e dos tripomastigotas, promovendo a vedação do vacúolo e assim impedindo que *T. cruzi* escape durante o processo de internalização (HALL et al. 1992; LEY et al. 1990; LOPEZ et al. 2002).

Em 2006, Rubin-de-Celis e colaboradores mostraram que o aumento na expressão de TS em TMC é responsável pela saída precoce dessas formas infectantes do VP para o citoplasma e subsequente diferenciação para formas amastigotas.

Atualmente, entendemos que a atividade de TS medeia vários efeitos biológicos que conduzem à subversão do sistema imunitário do hospedeiro, favorecendo assim tanto a sobrevivência do parasita como o estabelecimento de uma infecção crônica (NARDY et al., 2016).

Adicionalmente, as proteínas GP160/CRP e T-DAF de superfície ancoradas com GPI, membros da família TS-inativa, conferiram proteção contra a morte por mediação do complemento evitando a montagem da C3 convertase (NORRIS, 1998; TOMLINSON et al., 1994).

Além disso, os sialilglicoconjugados presentes na superfície do parasito devido à atividade de TS, podem ligar-se a lectinas do tipo Ig de ligação a SAcS (Siglec-E) em células dendríticas, suprimindo a produção de IL-12, uma citocina pró-inflamatória, prejudicando uma via de comunicação entre a resposta inata e adaptativa (ERDMANN et al., 2009).

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

Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e serina/treonina quinase (Akt) também são importantes reguladores do processo de invasão do *T. cruzi* em células não fagocíticas profissionais (WILKOWSKY et al., 2001). As PI3K regulam o processo de tráfico de membranas, fusão de endossomas e rearranjo do citoesqueleto (DOWNWARD, 2004). Esse processo de sinalização provavelmente modula a invasão mediada por lisossomas ou um outro associado à actina (PROCÓPIO; BARROS; MORTARA, 1999). Além de participar no processo de invasão, a via sinalização PI3K/Akt também estimula mecanismos pró-sobrevivência nas células parasitadas (CHUENKOVA et al., 2001).

Outra via de sinalização importante para invasão do *T. cruzi* é a que envolve o fator de crescimento beta (TGF- β). TGF- β é uma citocina que participa de inúmeros eventos celulares como a produção de matriz extracelular, regulação da miogênese, resposta imune, angiogênese e embriogênese. Experimentos com células epiteliais de pulmão deficientes nos receptores para TGF- β demonstraram que o *T. cruzi* é incapaz de infectar essas células (MING; EWEN; PEREIRA, 1995).

Recentemente foi mostrado que o bloqueio farmacológico de TGF- β com o composto SB-431542 pode ser uma nova ferramenta no controle da infecção de cardiomiócitos com *T. cruzi* (WAGHABI, et al., 2007).

Moléculas de superfície do parasito são reconhecidas por um tipo específico de receptor, os receptores do tipo Toll (TLRs) presentes nas células do hospedeiro (KAYAMA; TAKEDA, 2010; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). Os TLRs são receptores transmembrana do tipo 1 com domínio extracelular com repetições de leucina e uma cauda intracelular carboxi-terminal que contém uma região conservada denominada domínio de homologia Toll/receptor interleucina 1 (TIR). O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do ligante e pelo processo de dimerização dos receptores, fundamental para sua ativação (WYLLIE et al., 2000). Até o momento 11 TLRs humanos e 13 TLRs murinos foram descobertos nas células de mamíferos (AKIRA, UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Esses receptores atuam na resposta imune inata e são parte de um grupo específico de receptores denominados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs).

Os PRRs reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Um PAMP é uma molécula altamente conservada que é expressa por uma classe de microrganismos e não é expressa pelas células hospedeiras (CAMPOS; GAZZINELLI, 2004; GAZZINELLI; DENKERS, 2006).

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

Estudos *in vitro* da interação do parasito com células do hospedeiro nem sempre envolvem células que são alvos da infecção *in vivo*. Células tumorais e linhagens celulares de diferentes origens, comumente utilizadas nesses estudos, não representam verdadeiramente a situação de interação do parasito com células do hospedeiro mamífero (BARBOSA, 1999). Um dos pontos que ainda permanece em discussão, é o mecanismo de invasão por *T. cruzi* que ocorre em células fagocíticas e fagocíticas não profissionais.

Uma série de estudos tem mostrado que citocalasinas B (CB) e citocalasinas D (CD) bloqueiam a entrada de formas epimastigotas e tripomastigotas em macrófagos, células Vero, e fibroblastos (ALEXANDER 1975; EBERT; BARBOSA 1981; HENRÍQUEZ; PIRAS; PIRAS, 1981; MEIRELLES et al., 1982; NOGUEIRA;

COHN, 1976; ZENIAN; KIERSZENBAUM, 1983), enquanto outros mostraram que ocorre invasão de formas tripomastigotas em fibroblastos tratados com CB, células MDCK e células HeLa (SCHENKMAN; DIAS; NUSSENZWEIG, 1991; SCHENKMAN e MORTARA, 1992).

1.2.2 Infecção de células fagocíticas

Os macrófagos são também alvos da infecção parasitária, especialmente no início da infecção, quando TM são depositadas no tecido do hospedeiro por insetos. Além disso, os amastigotas liberados das células infectadas, também infectam macrófagos. Ambas as formas do parasito são absorvidas por fagocitose, inicialmente alojados em vacúolos parasitóforos, podem ser mortos por geração de óxido nítrico e peroxinitrito (ALVAREZ et al., 2011; RUBBO; DENICOLA; RADI, 1994; THOMSON et al., 1999).

A maturação dos vacúolos parasitóforos em fagolisossomas é importante para a sobrevivência do parasito, que é necessária para sua ida para o citoplasma, evitando assim a ação dos radicais livres tripanocidas. No citoplasma diferenciam-se e replicam como ocorrem em células não fagocíticas. A entrada inicial dos parasitos em macrófagos ocorre provavelmente por meio de um processo fagocítico dependente de actina e um processo de invasão ativa semelhante ao descrito acima para células não fagocíticas (revisado por WALKER et al., 2014).

Estudos ainda recentes indicam que a integridade dos microdomínios de membrana plasmática ("rafts"), compostos de colesterol, gangliósido GM, flotilina e caveolinas são importantes para o sucesso da infecção de macrófagos por formas tripomastigotas e amastigotas (BARRIAS et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; HISSA et al., 2012).

Não está claro se, no caso dos macrófagos, isso afeta apenas o processo de invasão ativa e/ou a via fagocítica. No entanto, a ruptura dos "rafts" parece diminuir a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas, provavelmente por desagregação de proteínas importantes das vias de sinalização que iniciam o processo de invasão (revisado por WALKER et al., 2014).

1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS E *Trypanosoma cruzi*

1.3.1 Aspectos gerais das células dendríticas

Células dendríticas (DCs) são células derivadas da medula óssea que pertencem ao grupo de células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo consideradas o membro mais importante devido à sua alta capacidade de reconhecer e internalizar antígenos no local da infecção (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013; HANIFFA et al., 2009). Elas ligam as respostas imunes inatas e adaptativas através da captura, processamento e expressão de antígenos na membrana de sua superfície celular (PLANELLES et al., 2003, STEINMAN, 2007).

As DCs imaturas possuem uma ampla gama de receptores inatos que permitem o reconhecimento de patógenos através de PRRs, que ativam as DCs através de vias de sinalização que induzem sua maturação (PEARCE; EVERTS, 2015). Os receptores TLRs, abundantes na APC e localizados na superfície celular ou no lúmen dos endossomos, são um dos PRRs mais caracterizados e detectam eficientemente PAMPs (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O reconhecimento eficiente de patógenos leva ao desenvolvimento de uma resposta imune inata adequada; por exemplo, TLR2, localizado na membrana plasmática da DC, detecta vários componentes de agentes patogênicos e a sua estimulação induz a produção de várias citocinas pró-inflamatórias. O TLR9, localizado no endolisossomo da DC, está envolvido no reconhecimento de vírus, bactérias, protozoários e sua ativação também leva à produção de citocinas pró-inflamatórias (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Após o reconhecimento do antígeno, as DCs podem deslocar-se ao longo do corpo a partir de tecidos periféricos para órgãos/tecidos linfóides onde apresentam os antígenos processados através dos seus complexos de histocompatibilidade principais (MHC) para as células T (LIPSCOMB; MASTEN, 2002).

O processo de maturação compreende a diferenciação das células especializadas na captura de antígenos em células especializadas na apresentação de antígenos e estimulação de células T. As DCs maduras podem ser identificadas por aspectos morfológicos como extensões citoplasmáticas e abundantes estruturas intracelulares (lisossomas, endossomas, grânulos, etc) relacionadas ao processamento de antígenos e pela modulação de marcadores moleculares como a

super expressão de CD83 e de moléculas co-estimuladoras como CD80 (ou B7-1) e CD86 (ou B7-2) e de MHC (O'NEILL; ADAMS; BHARDWAJ, 2004).

As células dendríticas apresentam antígenos aos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ via MHC de classe I e MHC de classe II, respectivamente (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013). Antígenos originários de fontes endógenas pelas moléculas do MHC de classe I; antígenos a partir de fontes exógenas pelo MHC de classe II. Algumas DCs têm uma capacidade típica, chamada apresentação cruzada, que permite carregar peptídeos de antígenos exógenos em moléculas do MHC de classe I (SEGURA; AMIGORENA, 2015; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008).

As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células nucleadas e a sua via de apresentação do antígeno consiste numa série de reações: (1) as proteínas intracelulares são degradadas pelo proteassoma; (2) os peptídeos são entregues ao retículo endoplasmático pelo transportador associado ao complexo de processamento de antígeno; (3) os antígenos são carregados em moléculas do MHC de classe I; (4) os complexos de peptídeo-MHC de classe I são transportados do Golgi até a superfície das células para a apresentação às células T CD8⁺ (NEEFJES et al., 2011; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008;). Recentemente demonstrou-se que a infecção de células HeLa por *T. cruzi* cepa Y promove uma regulação negativa da biossíntese das subunidades de proteassoma bem como da expressão da molécula do MHC de classe I, o que poderia ser considerado um mecanismo de persistência do parasito dentro da célula (CAMARGO et al., 2014).

Ao contrário da expressão do MHC de classe I, o MHC de classe II é principalmente expresso por APCs tais como DCs, macrófagos e células B (NEEFJES et al., 2011; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008). Os antígenos extracelulares são recolhidos por APCs e colocados no fagossoma. Este compartimento funde-se com os lisossomas para formar fagolisossomas, onde as moléculas do MHC de classe II interagem com os antígenos. As moléculas de MHC de classe II carregadas com peptídeo são então transportadas para a superfície celular onde ligam-se a células T CD4⁺ antígeno específicas (NEEFJES et al., 2011; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008).

Curiosamente, as moléculas de MHC de classe II estão em constante processo de reciclagem e degradação em DCs imaturas, mas as DCs maduras exibem uma apresentação de antígeno estável e prolongada (DEN HAAN; ARENS; ZELM, 2014).

Vale ressaltar que a apresentação de antígenos pela DC não é suficiente para ativação e proliferação dos linfócitos T. A expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de citocinas também são necessárias e são proporcionadas eficientemente por DCs maduras (DEN HAAN; ARENS; ZELM, 2014).

Após a ativação através de TLRs, as DCs podem produzir citocinas relacionadas à imunidade inata envolvidas em respostas locais e sistêmicas tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α ; no entanto, em condições específicas, as DCs também são capazes de produzirem IL-10 e TGF- β para dirigir uma resposta regulatória (HOLDSWORTH; CAN, 2015; VERHASSELT et al., 1997).

Diferentes subtipos de DCs e níveis de maturação podem produzir diferentes tipos de citocinas ou moléculas co-estimulatórias que levam a uma resposta inflamatória ou regulatória. Entre os subtipos de DC, a mielóide (mDC ou DC clássica), a plasmocitóide (pDC), as células de Langerhans (LCs) e as derivadas de monócitos (MdDCs) são alguns exemplos bem conhecidos.

Em murinos, as mDCs são compostas por dois grupos principais: residentes e migratórias, que são divididas em dois subtipos: DCs dependentes de Batf3 e dependentes de IRF4 (Revisado por DURAND; SEGURA, 2015). mDC Batf3-dependente/migratória expressa CD11c, Clec9A, XCR1, CD103 e CD207; enquanto que a residente expressa CD11c, Clec9A, XCR1 e CD8. Por outro lado, mDC IRF4-dependente/residente expressa CD11c, CD11b, CD172a; os mesmos marcadores são encontrados nos subtipos migratórios junto com CD206 (Revisado por SEGURA, 2016), figura 2.








Os principais marcadores para pDC são CD11c, Ly6c, B220 e Siglec H. Para MdDCs, eles são CD11c, CD11b, CD64, Fc ϵ RI, CD206, CD14, CD172a e Ly6c (Revisado por SEGURA, 2016), figura 2.

Finalmente, LCs são uma população especial de DC presente na epiderme e em outros epitélios escamosos estratificados, como membranas mucosas orais e genitais e brônquios. Apesar de estarem associadas a estes tecidos, as LCs podem diferenciar-se em células migratórias para a apresentação de antígenos. Os seus marcadores principais são CD11c, CD207, EpCAM e E-caderina (Revisado por GORDON et al., 2014), figura 2.

Os marcadores clássicos das MDCs humanas são CD11c, Dectin 1 (CLEC7A) e Dectin 2 (CLEC6A). Em relação às pDCs, CD303 (CLEC4C), CD304 (neuropilina) e CD123 (IL-3R) são marcadores humanos comuns. As MDCs podem expressar CD14, CD209 (DC-SIGN), CD16 e CD1c (Revisado por COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013), figura 2.

Lewis e Reizis (2012) propuseram a existência de mais dois tipos de DCs dentro desses subtipos: células “receptoras” mais especializadas na captura de antígenos e produção de citocinas e células “apresentadoras”, células que se beneficiam dessas citocinas e migram para os linfonodos para apresentar os antígenos, representando outro nível de especialização entre as DCs, indicando sua diversidade e sua capacidade de orientar a polaridade, a magnitude e a especificidade das respostas imunes.

Figura 4. Subtipos de células dendríticas murinas e humanas e seus marcadores fenotípicos.

	pDC	cDC residente		cDC migratória		Langerhans	DC inflamatória
							
MURINO	CD11c Ly6C B220 Siglec H	<i>Batf3-dep</i> CD11c Clec9A XCR1 CD8	<i>IRF4-dep</i> CD11c CD11b CD172a	<i>Batf3-dep</i> CD11c Clec9A XCR1 CD103 CD207	<i>IRF4-dep</i> CD11c CD11b CD172a CD206	CD11c CD207 EpCAM E-cadherin	CD11c CD64 FcεRI CD206 CD14 Ly6C
HUMANO	CD123 CD303 CD304	CD11c Clec9A XCR1 CD141	CD11c CD11b CD172a CD1c	CD11c Clec9A XCR1 CD141	<i>CD1a DC</i> CD11c CD11b CD172a CD1c CD1a CD206	<i>CD14 DC</i> CD11c CD11b CD172a CD1c CD14 CD141 CD206	CD11c CD64 FcεRI CD206 CD14 CD1c CD1a

Fonte: Adaptado de SEGURA; AMIGORENA (2015).

Alguns estudos demonstraram que as fases aguda e crônica da doença de Chagas requerem diferentes polarizações da resposta imune: a resposta Th1 é protetora na fase aguda e a resposta regulatória é importante na prevenção da fase crônica (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014, DUTRA et al., 2015).

Por esta razão, as DCs são um grupo-chave de células na doença de Chagas: elas podem modular a resposta dependendo do tipo, nível de maturação,

tipos de citocinas e receptor da DC envolvidos, tendo um papel fundamental no desenvolvimento das formas da doença, incluindo o estágio indeterminado.

1.3.2 Células dendríticas murinas e *Trypanosoma cruzi*

Estudos sobre a doença de Chagas aguda em seres humanos são limitados devido à falta de sintomas únicos que caracterizam este estado da doença. No entanto, ampliar o conhecimento sobre a fase aguda é importante porque os eventos imunológicos que ocorrem nesta etapa têm grande influência no possível desenvolvimento da fase crônica. Neste contexto, a infecção murina experimental pode imitar a doença humana, dando-nos uma visão semelhante ao que acontece no início da infecção por *T. cruzi* (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

Diferente da resposta habitual das DCs durante uma infecção, a expressão de importantes moléculas de superfície como MHC, CD80 ou CD86 pode ser reduzida quando as DCs reconhecem os antígenos de *T. cruzi* de forma dependente da cepa, limitando a maturação da DC e a sua capacidade de apresentação de antígeno (GIL-JARAMILLO et al., 2016). Durante a fase aguda, as DCs esplênicas infectadas pela cepa Tehuantepec do *T. cruzi* apresentam baixa expressão de moléculas CD86 e são incapazes de migrarem para órgãos/tecidos linfóides (CHAUSSABEL et al., 2003). A cepa RA altamente virulenta do *T. cruzi* (TcVI) em DCs de medula óssea, induz uma regulação para baixo da produção de citocinas e da capacidade endocítica adicionada a uma supressão do MHC de classe II, em comparação com as células não infectadas (PONCINI et al., 2008). Estes dados estão em concordância com o estudo de Alba Soto e colaboradores (2003), que também detectaram uma expressão diminuída de MHC de classe II em DC esplênicas infectadas pela mesma cepa de *T. cruzi*. Além disso, mostraram que o comportamento da DC induzido pela cepa RA não ocorre para a cepa não virulenta K98 do *T. cruzi* (TcI).

Outro estudo comparativo de infecção, usando MdDCs, foi realizado usando cepas de 2 DTUs diferentes, TcI (AQ1.7 e MUTUM) e TcII (1849 e 2369) (DA COSTA et al., 2014). DTU (*discrete typing unit*) é definido como um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por

marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998). *T. cruzi* foi dividido em 6 DTUs (ZINGALES et al., 2009).

Os resultados obtidos por Da Costa e colaboradores (2014) demonstraram que as DTUs de *T. cruzi* estudadas podem modular DCs em diferentes extensões e esta modulação variou mais entre as cepas do que entre as DTUs. Em geral, ambas as DTUs induziram a produção e a expressão de moléculas anti-inflamatórias, tais como IL-10, produção de PD-L1 e expressão de TLR2. Em relação à expressão de TLR2, parece que *T. cruzi* tem moléculas que se ligam a este receptor promovendo a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (DA COSTA et al., 2014).

Em contrapartida, as moléculas pró-inflamatórias não apresentaram um padrão, variando dependendo da cepa. Finalmente, eles também demonstraram que a expressão da DC de moléculas de diferenciação e ativação não foi polarizada, o que sugere que cada cepa de *T. cruzi* possivelmente desenvolveu estratégias específicas de evasão (DA COSTA et al., 2014).

Quando duas linhagens de camundongos foram infectadas pela cepa Y do *T. cruzi* altamente virulenta (TcII), a suscetível mostrou DCs esplênicas com capacidade reduzida de apresentação de antígenos e menor expressão de moléculas CD40 e CD86 em comparação com a linhagem resistente (PLANELLES et al. 2003). É bem conhecido que a deficiência de sinais co-estimuladores durante a apresentação cruzada pode reduzir a estimulação das células T ou conduzir a um estado anérgico. Assim, parece que a função prejudicada da DC pode ajudar o parasita a evadir do sistema imunológico do hospedeiro (BOUSSIOTIS et al., 1996).

A produção de citocinas é outro aspecto importante durante as interações DCs - *T. cruzi*, particularmente a produção de IL-12, considerada uma molécula protetora durante a infecção aguda, uma vez que ativa uma resposta adaptativa Th1 polarizada que permite ao hospedeiro controlar adequadamente o crescimento do parasito através de IFN- γ (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Em concordância, DCs de linhagens de camundongos resistentes a *T. cruzi* super expressaram IL-12 e TNF- α enquanto que as linhagens susceptíveis produziram a citocina IL-4 de perfil Th2 (PLANELLES et al., 2003). Sabe-se que a IL-4 medeia a susceptibilidade do hospedeiro ao *T. cruzi*, mas também é necessária para prevenir a hiperatividade imunológica e a imunopatologia (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996; LAUCELLA; ROTTENBERG; TITTO, 1996).

Terrazas e colaboradores (2011) demonstraram o papel protetor da IL-12 através da infecção por *T. cruzi* cepa Queretaro (Tcl) de camundongos deficientes em MIF (fator inibidor da migração de macrófagos). O MIF é uma citocina pleiotrópica produzida por vários tipos de células diferentes, incluindo DCs, que modula a expressão de várias moléculas pró-inflamatórias (COOKE; ARMSTRONG; DONNELLY, 2009). Parece que ele favorece a maturação da DC através da secreção de IL-12 e da ativação da proteína p38 MAPK, uma quinase envolvida na maturação da DC. Por outro lado, camundongos deficientes em MIF apresentaram níveis mais baixos da produção de IL-12 e DCs de medula óssea imaturas, levando a uma susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* Queretaro (Tcl).

A citocina reguladora IL-10 também está associada à suscetibilidade do hospedeiro durante o estágio agudo da doença de Chagas, limitando a indução de mecanismos efetores antimicrobianos por parte das DCs, como a supressão da migração da DC para os linfonodos de drenagem (ALBA SOTO et al., 2010; CORINTI et al., 2001; DEMANGEL; BERTOLINO; BRITTON, 2002). Uma única injeção intravenosa de DCs deficientes em IL-10 que foram pulsadas com antígenos parasitários conferiu um controle eficaz contra um desafio letal com a cepa de *T. cruzi* RA em camundongos. As DCs deficientes em IL-10 eram produtoras de níveis elevados de citocinas Th1 e indutoras de linfócitos T antígeno-específicos após a imunização (ALBA SOTO et al., 2010).

Por outro lado, Poncini e colaboradores (2010) demonstraram que a interação de DCs com tripomastigotas de *T. cruzi* foi incapaz de ativar as DCs, e estas células se tornaram produtoras de TGF- β e IL-10 e não foram eficientes como estimuladoras de linfócitos, sendo classificadas como DCs regulatórias.

As DCs maduras têm a capacidade de induzir a ativação e proliferação das células NK. As células NK desempenham um papel significativo na resposta imune inata e na vigilância como resultado da sua produção de citocinas e citólise das células infectadas. Além disso, as células NK secretam IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, que promovem a maturação da DC e a ativação de células T (GEROSA et al., 2002; PICCIOLI et al., 2002).

Também foi demonstrado o importante papel dos TLRs no reconhecimento do *T. cruzi* pela primeira linha de células de defesa, incluindo DCs. A infecção com *T. cruzi* induz o recrutamento de TLR9 para o compartimento endolisossomal, promovendo sua interação durante a fagocitose inicial. Os motivos estimuladores

contendo CpG de *T. cruzi* CL Brener, particularmente aqueles formados por genes que codificam proteínas semelhantes à mucina, também levaram o TLR9 aos lisossomas de DC de medula óssea e à indução de IL-12 bem como à síntese de IFN- γ (BARTHOLOMEU et al., 2008). Tal atividade próinflamatória potente e, conseqüentemente, o controle da replicação do parasita, poderia levar à resistência do hospedeiro à infecção ou evitar a letalidade do hospedeiro e à manutenção da persistência do parasita de ciclo de vida longo.

A segunda hipótese sugere outra adaptação do *T. cruzi* à imunidade mediada por células hospedeiras (BARTHOLOMEU et al., 2008). Gravina e colaboradores (2013) afirmaram que a população de DC constitui a principal fonte de produção de IL-12/IL-23p40 em uma via dependente de TLR9 na infecção por *T. cruzi* cepa Y. Além disso, quando as DCs eram incapazes de produzir IL-12/IL-23p40, os macrófagos recuperaram a sua capacidade de responder ao agonista de TLR9, o que pode representar uma resposta compensatória. Por conseguinte, a modulação de TLR9 é importante para controlar a resposta inflamatória nas diferentes células, mas TLR9 atua fundamentalmente na atividade inflamatória da DC na infecção por *T. cruzi* (GRAVINA et al., 2013).

A sinergia entre TLRs em DCs infectadas por parasitas também foi estudada. Quando os camundongos deficientes em MyD88/TRIF (Toll/IL-1R contendo o adaptador que induz o IFN- β) (isto é, sem ativação funcional dos TLRs) foram infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* (TcVI), a depuração do parasito foi prejudicada principalmente pela ausência da produção de IFN- β (KOGA et al., 2006). No mesmo trabalho, foi proposto que a produção de citocinas pró-inflamatórias é uma indução dependente de MyD88 e a expressão de IFN- β é dependente de TRIF. Em qualquer caso, ambos os adaptadores de TLR contribuem para respostas imunes inatas contra a infecção por *T. cruzi* (KOGA et al., 2006).

A proteína UNC93B1, que interage com TLR3, TLR7 e TLR9, parece desempenhar um papel essencial na proteção do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi* (CAETANO et al., 2011). Os camundongos deficientes em UNC93B1 foram mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* e produziram uma concentração mais baixa de IL-12p40 e IFN- γ . Essa susceptibilidade também foi alcançada durante a infecção pelo *T. cruzi* com camundongos deficientes em TLR3/TLR7/TLR9, demonstrando

que os TLRs sensores de ácidos nucleicos são determinantes críticos da resistência do hospedeiro à infecção primária com *T. cruzi* (CAETANO et al., 2011).

Outros receptores também têm sido propostos para desempenhar um papel importante durante a fase aguda da doença de Chagas. Os camundongos deficientes em receptores B₂ (B₂R) de bradicinina (BK) foram mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* cepa Dm28c (Tcl) do que os animais WT (MONTEIRO et al., 2007). Os B₂Rs reconhecem cininas liberadas por *T. cruzi*, mediadores relacionados à bradicinina que ativam DCs imaturas (MONTEIRO et al., 2006). As DCs esplênicas sem receptor B₂R não produzem IL-12, apontando um papel crítico para a via de sinalização das cininas no desenvolvimento de células T efetoras do tipo 1 (MONTEIRO et al., 2007). Num estudo recente, o mesmo grupo demonstrou que o bloqueio de B₂R juntamente com o receptor C5a resultou em DCs esplênicas incapazes de produzir IL-12p40/70 e IFN- γ (SCHMITZ et al., 2014). C5a é uma anafilatoxina derivada da proteólise do complexo C5 do sistema complemento, cuja função biológica é ativar células da linhagem mielóide (KLOS et al., 2009). No entanto, eles mostraram que as moléculas de C5a parecem ser produzidas através da atividade da cruzipaina do *T. cruzi* durante a infecção e podem promover a ativação da DC e uma resposta protetora Th1 (SCHMITZ et al., 2014).

As galectinas, receptores de lectina, também podem atuar como receptores de reconhecimento de patógenos e como moduladores da resposta inata e adaptativa (VASTA, 2009). Foi demonstrado que esses receptores são amplamente expressos em células B, macrófagos e DCs durante a infecção por *T. cruzi* (VRAY et al., 2004; ZÚÑIGA et al., 2001a, b).

No que se refere às DCs, a galectina-1 parece ser um imunorregulador negativo que limita a resposta protetora do hospedeiro ao induzir circuitos tolerogênicos em DCs. Estas DCs tolerogênicas induzem a ativação das células T regulatórias, o que favorece a persistência do parasita nos tecidos do hospedeiro ou limita o dano tecidual colateral através da supressão das respostas inflamatórias (PONCINI et al., 2015).

Galectina-3 (Gal-3) e seus ligantes específicos foram super-expressos em DC esplênicas após infecção por *T. cruzi* cepa Tehuantepec, o que levou ao aumento da adesividade e à redução da migração. Portanto, *T. cruzi* modula a funcionalidade de Gal-3 e seus ligandos para melhorar a infecção, outra propriedade imunomoduladora do *T. cruzi* (VRAY et al., 2004).

Outro receptor semelhante à lectina expresso por células do sistema imune, Siglec-E (lectina-E semelhante a imunoglobulina de ligação do ácido siálico), também tem sido implicado na infecção por *T. cruzi*. É bem sabido que a transferência do ácido siálico pela trans-sialidase (TS) do *T. cruzi* da célula hospedeira para moléculas semelhantes à mucina na superfície do parasita confere resistência ao complemento humano, contribuindo para a infecção (TOMLINSON et al., 1994).

Além disso, como citado anteriormente na seção 1.2.1, Erdmann e colaboradores (2009) descreveram que a interação TS–Siglec-E resulta em um efeito inibidor na modulação das DCs, pela supressão da produção de citocina IL-12.

Juntos, esses achados sugerem que o *T. cruzi* (ou produtos parasitários) pode levar à imunossupressão através de sua interação com os receptores de lectina da DC (TERRAZAS; TERRAZAS; GÓMEZ-GARCIA, 2010).

Slamf1 (molécula de adesão auto-ligante - CD150) é uma molécula co-estimulatória presente na linhagem mielóide e necessária na interface das células apresentadoras de antígeno e células T (VAN DRIEL et al., 2016). Experiências *in vitro* e *in vivo* revelaram que as células mielóides deficientes em Slamf1 apresentaram produção alterada de citocinas e reduziram a replicação parasitária. Foi detectada uma produção de IFN- γ muito mais baixa no coração de camundongos deficientes em Slamf1 do que no coração de camundongos WT. Além disso, os camundongos deficientes em Slamf1 apresentaram danos cardíacos reduzidos apesar do número comparável de infiltrado de DCs, macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em comparação com os animais WT. Portanto, o *T. cruzi* requer Slamf1 para se replicar nas DCs e sua ausência leva a uma menor produção de fatores específicos de células mielóides pelas DCs, que são compostos chave para a resposta imune e os resultados da infecção (CALDERÓN et al., 2012).

1.3.3 Células dendríticas humanas e *Trypanosoma cruzi*

O primeiro experimento que confirmou a habilidade do *T. cruzi* infectar e reproduzir-se no interior das DCs humanas foi realizado em 1999 por Van Overtvelt e colaboradores. Os autores também demonstraram que as DCs derivadas de

monócitos e infectadas por *T. cruzi* cepa Tehuantepec, reduziram significativamente a expressão de CD40 e HLA-DR e não produziram IL-12 e TNF- α .

Outro estudo do mesmo grupo, que utilizou a mesma cepa de *T. cruzi*, mostrou que fatores solúveis liberados por *T. cruzi* no meio de cultura das DCs inibiram a expressão de MHC de classe I induzida por LPS, na superfície das DCs humanas. Esta inibição pode diminuir o efeito protetor de células T CD8⁺ específicas uma vez que as DCs infectadas apresentam uma menor capacidade de apresentação cruzada, o que poderia influenciar a capacidade *in vivo* do hospedeiro de combater a infecção eficientemente (VAN OVERTVELT et al., 2002).

Sabe-se que a pequena família de glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) é abundante na superfície de *T. cruzi* e que tais moléculas parecem apresentar atividade imunoregulatória (BRODSKYN et al., 2002; MEDEIROS et al., 2007). GIPLs isolados de *T. cruzi* cepas G (TcI) e Y (TcII) foram incubados com DCs derivadas de monócitos estimuladas por LPS. Os resultados mostraram que antígenos GIPL direcionaram a regulação para baixo tanto de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- α , quanto de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. GIPLs do parasito também inibiram a expressão de moléculas co-estimulatórias HLA-DR, CD83, CD86, CD180 e CD40 na superfície das DCs (BRODSKYN et al., 2002). Resultados semelhantes foram encontrados quando a porção ceramida da molécula de GIPL foi utilizada para estimular as DCs, sugerindo que fragmentos de glicoproteínas do parasito poderiam representar uma estratégia de evasão do *T. cruzi* (BRODSKYN et al., 2002).

A proteína da família tiol-disulfureto oxiredutase (Tc52) liga-se e induz a maturação da DCs tanto murina quanto humana, via ativação do TLR2. DCs derivadas de monócitos tratadas com Tc52 apresentaram uma expressão mais elevada de CD83, CD86, CD54 e HLA-DR e uma produção elevada de IL-8, MCP-1 e MIP-1 α . Esses dados *in vitro* sugerem que Tc52 pode proporcionar recrutamento local e ativação de leucócitos e então a migração da DC aos linfonodos, onde podem desencadear respostas de células T e B (OUASSI et al., 2002).

Parasitas da cepa Tulahuen de *T. cruzi* aumentaram a expressão de CD40 e CD80 em mDCs de sangue de cordão umbilical em um nível mais elevado em comparação com mDCs de doadores adultos. A proliferação de células T CD8⁺

também foi estimulada pelas mDCs de sangue de cordão umbilical (RODRÍGUEZ; CARLIER; TRUYENS, 2012a).

Outro estudo, realizado pelo mesmo grupo, mostrou que o *T. cruzi* pode induzir a maturação da mDC sem infectá-la. Rodriguez, Carlier e Truyens (2012b) demonstraram que as mDCs de sangue de cordão umbilical e de adultos que tiveram contato com o parasito mas não foram infectadas, expressaram altos níveis de CD80 e CD83. Além disso, eles demonstraram que tanto mDC infectadas quanto lisados de *T. cruzi* co-incubados com mDCs levaram a uma expressão padrão semelhante de suas moléculas de superfície. Os autores mostraram também que a taxa de infecção nas mDCs foi menor que em monócitos e granulócitos, possivelmente devido à sua capacidade elevada de fagocitose quando comparadas com as DCs maduras (RODRÍGUEZ; CARLIER; TRUYENS, 2012b).

A modulação da função da DC varia de acordo com a cepa de *T. cruzi*. Em um estudo comparativo, Magalhães e colaboradores (2015) demonstraram que a cepa Col cl1.7 (TcI) induz a super expressão de CD80 e CD86, ao contrário da cepa Y (TcII). A cepa Y (TcII) induz um aumento na produção de IL-10, TNF- α e granzima A, enquanto que linfócitos T CD8⁺ ativados pela cepa Col cl1.7 produziram níveis elevados de IL-17. Resumindo, a cepa TcI foi capaz de uma maior ativação de monócitos, enquanto que a cepa TcII induziu um perfil mais inflamatório.

O que se sabe até agora sobre a interação entre DCs humanas e *T. cruzi* se restringe a modelos *in vitro*, onde a expressão de algumas citocinas e moléculas de superfície foram analisadas, mas as funções específicas dos subtipos de DCs estão apenas no início de serem desvendadas.

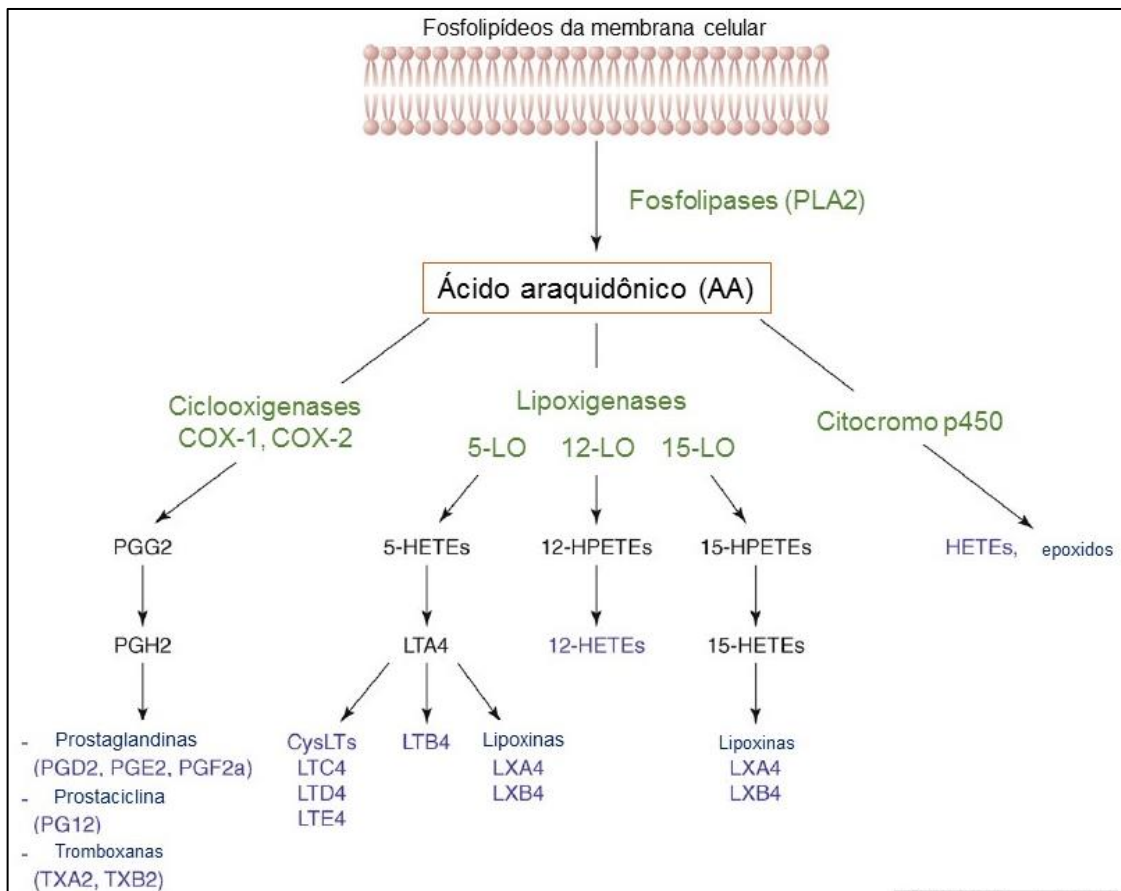
No entanto, parece que as cepas virulentas de *T. cruzi* provavelmente aproveitam-se das DCs suscetíveis para driblar a resposta imune do hospedeiro e instalar a infecção com sucesso. Desta forma, as DCs moduladas irão conduzir uma resposta adaptativa fraca com baixa expressão de moléculas do MHC de classe I e II e citocinas pró-inflamatórias, que são fundamentais para o controle da sobrevivência do parasita (ALBA SOTO et al. 2010; DA COSTA et al., 2014; PONCINI et al., 2008).

1.4 EICOSANOIDES

Os eicosanoides são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico. Células da imunidade inata, incluindo macrófagos residentes, células dendríticas sentinelas e neutrófilos, são as maiores produtoras de eicosanoides (PHIPPS; STEIN; ROPER, 1991), que incluem as prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LTs) e as lipoxinas (LXs). Tais mediadores recebem especial atenção devido à sua importância na patogênese de diversas doenças inflamatórias e imunológicas (HARIZI, CORCUFF; GUALDE, 2008).

A síntese de eicosanoides pode ser ativada por diversos estímulos, como ação de fatores de crescimento, processo inflamatório ou trauma mecânico. Tais estímulos induzem a expressão e ativação da enzima fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), a qual catalisa a liberação do ácido araquidônico (AA) endógeno da membrana citoplasmática (figura 5) (FUNK, 2001; SEIBERT et al., 1994)

Figura 5. Metabolismo dos eicosanoides.



Fonte: Adaptado de HARIZI; CORCUFF; GUALDE (2008).

O AA liberado da membrana pode ser metabolizado através de três vias enzimáticas distintas: (a) pela via da ciclooxigenase (COX), a qual será detalhada na próxima seção, (b) pela via da lipoxigenase (LO) produzindo leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), o ácido hidroperoxieicosatetraenóico (HPETE) e o ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE); e (c) pela via da citocromo p450 monooxigenase produzindo epóxi ácidos e 20-HETE (figura 5). Pode ocorrer ainda uma via não enzimática, onde o AA sofre peroxidação mediada por radicais livres gerando isoprostanos (BOTTING 2006a; HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008; MACHADO et al., 2011; MEDEIROS et al., 2012; MORROW et al., 1990).

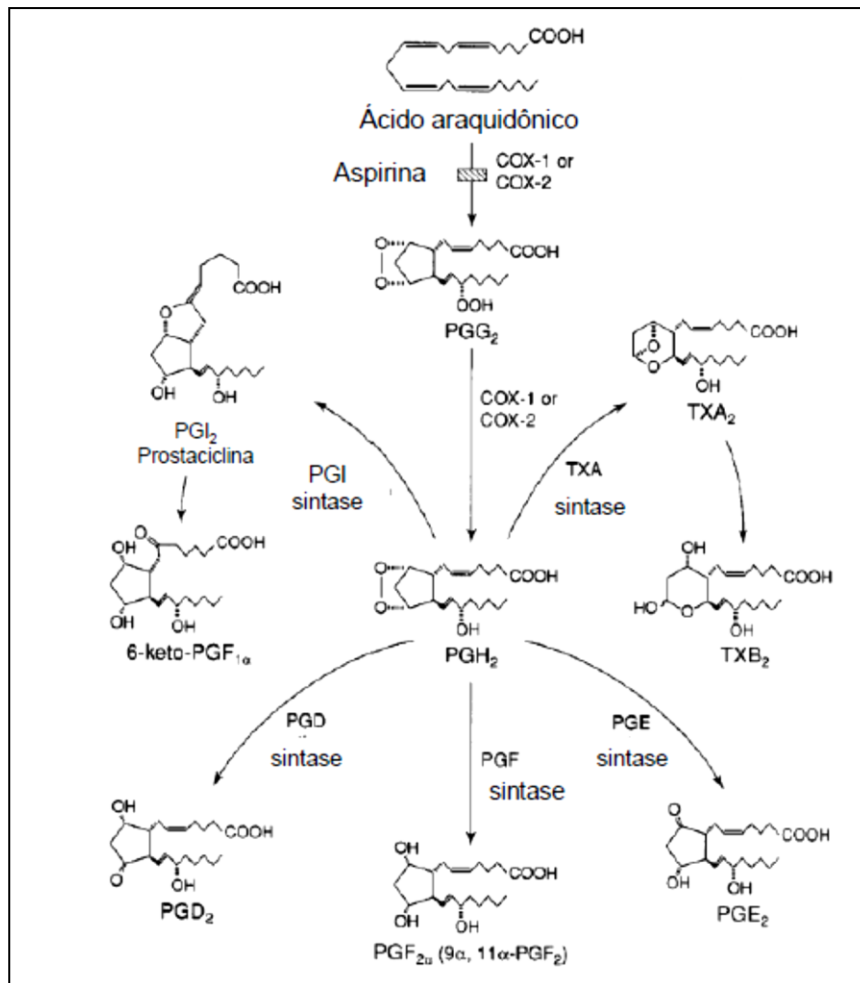
1.4.1 Via da ciclooxigenase e receptores prostanoides

O AA sofre ciclização dependente de oxigênio pela enzima ciclooxigenase (COX) ou prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS), para formar prostaglandina G_2 (PGG_2) que subsequentemente sofre a ação de peroxidase pela mesma COX sendo reduzida ao seu endoperóxido instável PGH_2 , a qual é convertida por sintases tecido específicas em outros prostanóides bioativos: PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostaciclina) e tromboxana A₂ (TXA_2) (figura 6) (BOTTING 2006a, MEDEIROS et al., 2012).

As plaquetas sintetizam principalmente TXA_2 , enquanto que as células endoteliais produzem PGI_2 . PGD_2 é produzida por mastócitos e no cérebro, enquanto que PGE_2 é um mediador importante nas células renais e estomacais e no processo inflamatório (BOTTING, 2006b).

Coletivamente esses produtos são chamados de prostanoides e os receptores que medeiam suas ações são os receptores de prostanoides (REGAN, 2003).

Figura 6. A cascata do ácido araquidônico – via da ciclooxygenase.



Fonte: Adaptado de BOTTING (2006a).

Os efeitos da PGE_2 são exercidos por receptores PGE específicos na membrana plasmática das células alvo designados receptores EP (para receptores prostanóides E) (HALUSHKA, et al., 1989) que existem em quatro subtipos: EP_{1-4} , (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999). $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_2 exercem suas ações através de receptores FP, IP e TP, respectivamente. Os efeitos de PGD_2 são mediados por dois receptores denominados DP_1 e DP_2 , um GPCR recentemente descoberto, expresso em células Th2 e também conhecido como CRTh2. Este receptor liga tanto o PGD_2 como o seu metabolito 15-desoxi PGJ_2 . A ligação de 15-desoxi PGJ_2 resulta na liberação de cálcio intracelular, em oposição aos aumentos de AMPc que ocorrem quando PGD_2 se liga ao seu receptor DP_1 tradicional (HIRAI et al., 2001).

Os receptores de prostanoides pertencem a três grupos (com base em atributos de homologia e sinalização, em vez de propriedades de ligação ao ligante)

dentro de tipos distintos da superfamília GPCR, proteínas com sete porções transmembranas. A única exceção é DP₂, que é um membro do subgrupo de receptores de quimiocinas. Os receptores IP, DP₁, EP₂ e EP₄, formam uma sinalização de cluster através de aumentos mediados por G_s no AMPc intracelular (COLEMAN et al., 1995; KATSUYAMA et al., 1995).

Os receptores EP₁, FP e TP, formam um segundo grupo que sinaliza através de aumentos mediados por G_q no cálcio intracelular. O receptor EP₃ é considerado um receptor "inibitório". A sinalização pelo receptor EP₃ é mais complexa devido às múltiplas isoformas do receptor EP₃ geradas por splicing alternativo a partir de um único gene do receptor EP₃. Estas isoformas de receptores EP₃ são acopladas a diferentes vias de sinalização, incluindo G_i, G_s e cálcio. A existência de quatro subtipos de receptores para PGE₂ é notável, dado que os outros prostanoídeos têm apenas um único receptor. Esta família complexa de receptores EP acoplados a sinais intracelulares distintos fornece uma base molecular para as diversas ações fisiológicas e, às vezes, antagônicas de PGE₂ em uma variedade de tipos celulares (BREYER; BAGDASSARIAN, 2001).

1.4.1.1 Enzima ciclooxygenase

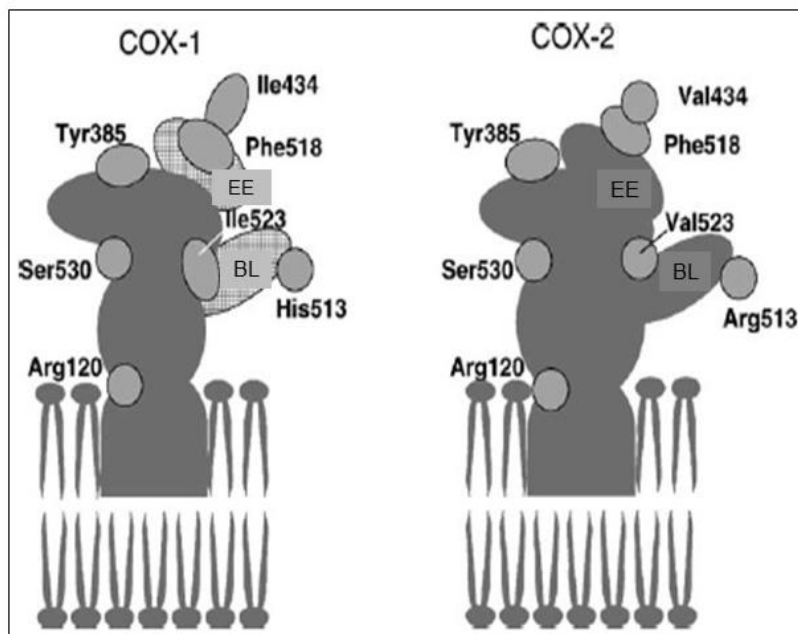
Existem duas isoformas de COX, uma constitutiva (COX-1) e uma induzível (COX-2). A COX-1 está envolvida basicamente com funções fisiológicas, tais como regulação da secreção de muco gástrico, ativação plaquetária, tônus vascular e manutenção da função renal, enquanto que a COX-2 atua na inflamação, câncer e dano tecidual. Estas enzimas são o principal alvo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES). Ambas as enzimas estão presentes no estado ativo no retículo endoplasmático e no envelope nuclear (HAEGGSTROM et al., 2010; MEDEIROS et al, 2012; ROUZER e MARNETT, 2008).

COX-1 e COX-2 apresentam o mesmo peso molecular, 71 kDa, porém a sequência de aminoácidos da enzima COX-2 apresenta homologia de 60% com a COX-1. Ambas exibem uma estrutura tridimensional composta por três unidades independentes dobradas: um domínio N-terminal semelhante ao fator de crescimento epidermal, um domínio alfa hélice de ligação à membrana e um domínio globular C-terminal, o qual acomoda o sítio enzimático (BOTTING 2006a), tanto de

ciclooxigenase quanto de peroxidase, sendo que este último contém um cofator heme (SMITH; SONG, 2002).

O sítio ativo, que consiste de um longo e estreito canal hidrofóbico, na COX-2 é ligeiramente maior e pode acomodar estruturas maiores do que as que são capazes de se encaixar no sítio ativo da COX-1 (KURUMBAIL et al, 1996). Uma bolsa lateral interna secundária da COX-2 contribui significativamente para o maior volume do sítio ativo nesta enzima, embora o canal central também seja mais amplo em aproximadamente 17%. Essa diferença se dá pela variação na sequência de dois aminoácidos, Ile 523 é substituído por Val523 na COX-2 (figura 7). O acesso a este lugar é estericamente inadequado na COX-1 pela cadeia lateral longa de Ile523. Os locais de ligação do ácido araquidônico e AINES estão posicionados no meio superior do canal, Tyr385 e Ser530, enquanto que Arg120 fica na abertura do canal (BOTTING 2006a; GARAVITO; MALKOWSKI; DEWITT, 2002, KURUMBAIL et al, 1996).

Figura 7. Sítio ativo da ciclooxigenase. EE = espaço extra. BL = bolsa lateral.



Fonte: Adaptado de BOTTING (2006a).

A atividade da COX é dependente da orientação apropriada do substrato no interior do sítio ativo, um processo que ocorre pela interação do AA com resíduos específicos de aminoácidos. Tyr385 que é catalítico e onde ocorre a remoção do

hidrogênio do C13 do AA, Gly533 e Tyr348, os resíduos que orientam o C13 para a remoção do hidrogênio; Arg120, o resíduo responsável pela interação eletrostática com o ânion carboxilato do AA, e os resíduos que governam a orientação do AA de tal forma a gerar PGG₂, Val349, Trp387 e Leu534 (MALKOWSKI et al., 2000; RIEKE et al., 1999; THURESSON et al., 2001).

1.4.2 PGE₂ e DCs

PGE₂ é uma das principais prostaglandinas produzidas em grande quantidade pelas APCs ativadas, atuando como um regulador autocrino de sua atividade (RUSSELL; PACE, 1984; DUBOIS et al., 1998). Além de suprimir a proliferação de células T humanas (GOODWIN; BANKHURST; MESSNER, 1977; MINAKUCHI et al., 1990), inibir a produção de citocinas pró inflamatórias por macrófagos (SCALES et al., 1989; VAN DER POUW KRAAN et al., 1995) e inibir a expressão de moléculas de MHC de classe II (SNYDER; BELLER; UNANUE, 1982), a PGE₂ é um modulador chave da função das DCs (HARIZI et al., 2001).

PGE₂ exerce diferentes efeitos dependendo do estado de maturação da DC. Nos tecidos periféricos, PGE₂ parece exercer efeito estimulatório em DCs imaturas. De fato, PGE₂ coopera com as citocinas inflamatórias tais como, TNF- α , IL-1 β e IL-6 promovendo a maturação da DC (KÚDELA et al., 2001; ZELLER-RIESER et al., 2002). DC maduras expressam o receptor de quimiocina CCR7 e migram através dos vasos linfáticos para órgãos linfoides em resposta a gradientes quimiotáticos dos ligandos de CCR7 (LUFT et al., 2002; SCANDELLA et al., 2002). Nos órgãos linfoides, PGE₂ assume um papel regulatório, reduzindo a ativação da DC e sua habilidade em apresentar antígeno às células T (HARIZI et al., 2001). Outra ação estabelecida da PGE₂ na função da DC é a regulação da produção de citocinas, dependendo do contexto e do microambiente. A presença de PGE₂ durante o contato da DC com o antígeno, inibe completamente sua capacidade em produzir a citocina que direciona a resposta Th1, a IL-12. Essas DCs produzem altos níveis de IL-10 (KALINSKI et al., 1997), a qual é conhecida como uma citocina regulatória (VASSILIOU; JING; GANEA, 2003). Além de seu potencial para modular a maturação, a capacidade de produção de IL-12 e capacidade de polarização da resposta Th, existem novas evidências diretas de que PGE₂ afeta a apoptose e a expressão do receptor de quimiocinas dessas APCs profissionais. Por exemplo, a

PGE₂ inibe a produção de quimiocinas inflamatórias CCL3 e CCL4 na DC derivada de medula óssea murina (BM-DC). Ao diminuir a liberação de quimiocinas, a PGE₂ pode atuar como um agente anti-inflamatório que previne o acúmulo excessivo de células imunes ativadas (JING; VASSILIOU; GANEA, 2003).

Estudos anteriores relataram que a PGE₂ pode atuar em células de maneira paracrina e desempenhar um papel crucial na interação célula/célula. Por exemplo, a PGE₂ derivada de monócitos tem efeitos supressivos na função APC de DC *in vivo*. Usando indometacina (inibidor de COX), Bjercke e Gaudernack (1985) forneceram evidências de que a função APC da DC pode, pelo menos em parte, ser atribuída à maior produção de PGE₂ por monócitos.

1.5 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) foram nomeados dessa forma para distingui-los dos anti-inflamatórios esteroidais, também usados para inibir o processo inflamatório. O AINE mais antigo é a aspirina ou ácido acetilsalicílico (ASA), com ações anti-inflamatória, analgésica e antipirética, além de apresentar efeitos colaterais como dano à mucosa gástrica, toxicidade renal e inibição da agregação plaquetária (BOTTING, 2010).

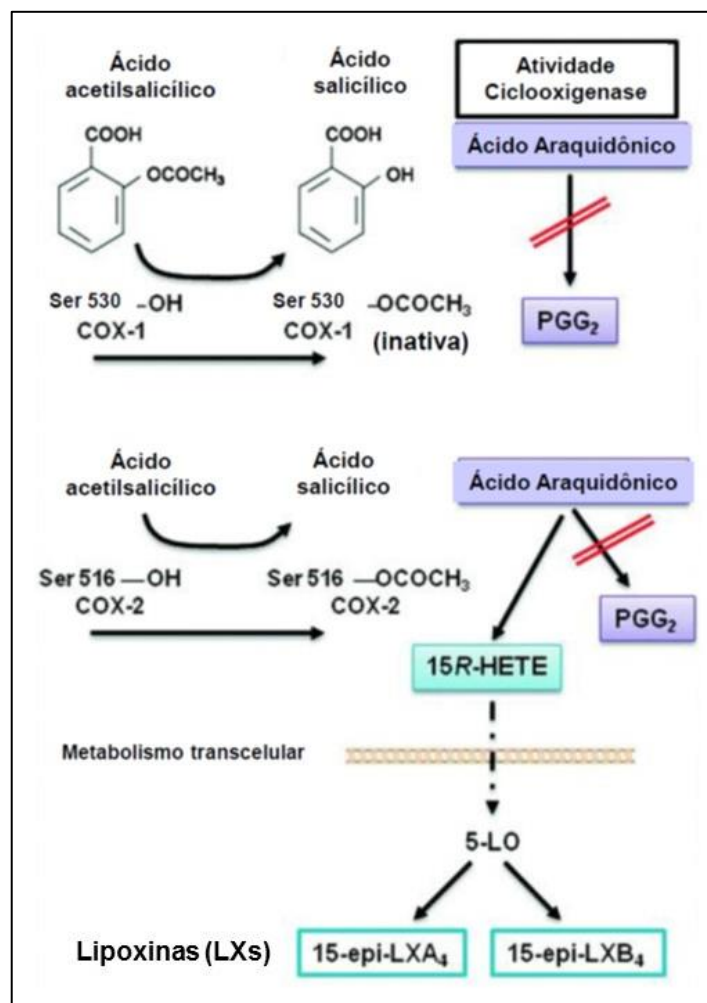
1.5.1 Aspirina

Originalmente obtida a partir de fontes vegetais, a aspirina foi primeiro sintetizada pelo alemão Felix Hoffman na Bayer Company em 1897, mas seu mecanismo de ação foi desvendado somente em 1971 por John R. Vane, que na época, demonstrou a inibição dose dependente da síntese de prostaglandina. Por suas descobertas em relação às prostaglandinas e substâncias biologicamente ativas relacionadas, Vane recebeu o prêmio Nobel no ano de 1982. A partir de 1971 vários estudos foram realizados para entender melhor o mecanismo de ação desse AINE que inibe a atividade da COX (BOTTING, 2006a).

O resíduo de serina na molécula da COX é o alvo da aspirina, que acetila o seu grupo hidroxila inibindo a ligação do AA, inibindo irreversivelmente a COX. Enquanto na COX-1 o resíduo Ser530 é acetilado, na COX-2 é o resíduo Ser516

(BOTTING, 2006b; VANE; BOTTING, 2003). A acetilação do resíduo Ser516 na COX-2 causa um impedimento estérico que limita o espaço disponível para acomodar a porção final da longa cadeia de carbonos do AA, distorcendo o AA no sítio ativo, o qual então é convertido em ácido 15(R)-hidroxieicosatetraenóico (15R-HETE). O 15R-HETE sofre a ação da 5-LO que o converte em 15-epi-lipoxinas, as chamadas lipoxinas desencadeadas pela aspirina (ATLs) (figura 8) (LECOMTE et al., 1994; SCHNEIDER; BRASH, 2000).

Figura 8. Esquema da ação da aspirina sobre a ciclooxigenase.



Fonte: Adaptado de www.researchgate.net/journal/0080-0015_Recent_results_in_cancer_research.

As ATLs levam à ativação da cascata de síntese das protectinas e resolvinas, as quais tem o efeito de inibir a migração e a síntese de IL-12 pelas DCs (SERHAN, CHIANG e VAN DYKE, 2008; SERHAN, YACOUBIAN e YANG, 2008).

Essas respostas celulares ativadas pelas ATLS resultam de sua interação com seu receptor específico (ALX), um receptor acoplado à proteína G para eicosanoides derivados da lipoxigenase (BENNETT; GILROY, 2016; SCHWAB; SERHAN, 2006).

A inibição eficiente da aspirina depende de sua ligação ao resíduo de Arg120 na COX (GARAVITO; DEWITT, 1999). A aspirina inicialmente forma uma ponte de hidrogênio entre seu grupamento carboxila e o resíduo de Arg120, o que coloca a molécula na orientação correta para causar a acetilação do resíduo de serina (TOSCO; LAZZARATO, 2009).

A aspirina também apresenta efeitos por mecanismos independentes de COX, os quais incluem a indução da síntese de NO (TAUBERT et al., 2004), aumento da produção de adenosina pelo estímulo da hidrólise de ATP (CRONSTEIN; MONTESINOS; WEISSMANN, 1999; CRONSTEIN et al., 1994) e a inibição da via de transcrição do fator nuclear kapa B (NF- κ B) (KOPP; GHOSH, 1994).

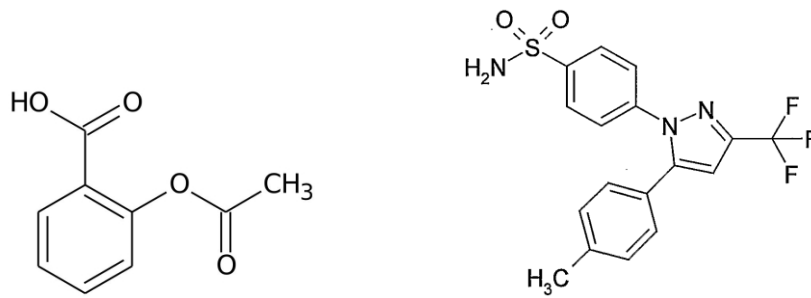
1.5.2 Celecoxibe

Os efeitos colaterais gástricos são os principais problemas dos AINEs não seletivos que atuam preferencialmente sobre a COX-1, como é o caso da aspirina. Devido a isso, a indústria farmacológica buscou desenvolver AINEs seletivos para COX-2. Assim, em 1999 surgiram os primeiros, o celecoxibe (Celebrex) e o rofecoxibe (Vioxx) (BOTTING, 2006a).

A estrutura química do celecoxibe contém um grupamento sulfonamida no lugar do grupo carboxila da aspirina (figura 9). Tal grupamento do celecoxibe liga-se ao resíduo de Arg513 no sítio catalítico da COX-2 (BOTTING, 2006b).

Embora não tenha efeitos gastrotóxicos, o celecoxibe apresenta efeitos cardiovasculares como demonstrado em estudos realizados por Solomon e colaboradores em 2005. Tal efeito é causado pela inibição da síntese da molécula anti-agregante plaquetária prostaciclina pelas células endoteliais sem atuar sobre a pró-trombótica tromboxana nas plaquetas (MCADAM et al., 1999).

Figura 9. Estrutura química da aspirina (esquerda) e do celecoxibe (direita).



Fonte: Domínio público.

Inicialmente o celecoxibe foi desenvolvido para o tratamento da dor crônica, porém vários autores demonstraram que é capaz de exercer efeitos independentes da inibição de COX-2, como por exemplo, atividade antitumoral pela modulação do citoesqueleto de actina que inibe a migração (BEHR et al, 2015), indução da apoptose de células tumorais (SCHÖNTHAL, 2007) e diminuição da sobrevida pela inibição do ciclo celular (GRÖSCH et al., 2001; GRÖSCH et al., 2006).

Em relação à resposta imune, além do efeito inibitório sobre a COX-2, Alloza e colaboradores (2006) demonstraram que celecoxibe e seu análogo [1-(4-sulfamoyl phenyl)-3-trifluoromethyl-5-(4-trifluoromethylphenyl) pyrazole inibem a expressão de IL-12 por aumentarem sua associação com a chaperona calreticulina, promovendo sua permanência no retículo endoplasmático em células 3H10-HEK. CHIBA e cols. (2012) demonstraram o mesmo efeito em macrófagos derivados de células U937 humanas e ativados por LPS. Ainda, a apoptose induzida pelo celecoxibe deriva da inibição da bomba de cálcio da membrana do retículo endoplasmático, aumentando os níveis citosólicos de cálcio que ativam os mecanismos de morte associados ao retículo endoplasmático (SCHÖNTHAL, 2007).

1.6 EICOSANOIDES e *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é capaz de sintetizar lipídios bioativos no cinetoplasto e sua síntese é regulada assim como nos mamíferos. O parasito não apresenta todas as vias sintéticas completamente, entretanto, é capaz de sintetizar ácidos graxos poliinsaturados a partir de precursores presentes no hospedeiro mamífero, como o

AA e o ácido eicosapentaenóico (LIVORE, TRIPODI; UTTARO, 2007; MACHADO et al., 2011).

A enzima PLA2 similar à dos humanos está presente e cliva a cadeia acil do AA presente nas membranas. Além disso, esta enzima é dependente de cálcio e sua atividade está aumentada nas formas infectantes do parasito. Assim, quando a enzima atua, ocorre a mobilização intracelular de cálcio e a ativação de diacilglicerol (DAG) e lisofosfatidilcolina, os quais ativam as proteínas quinases. Esse processo de sinalização é crítico para ocorrer a interação parasito-célula hospedeira que antecede a invasão (Revisado por MACHADO et al, 2011).

O *T. cruzi* também apresenta a fosfolipase A1 (Tc-PLA1) que atua sobre os lipídios da célula hospedeira para gerar mensageiros secundários lipídicos (DAG, ácidos graxos livres, lisofosfolipídios) e concomitante ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC tem sido implicada no aumento da invasão, sugerindo que a Tc-PLA1 está envolvida nos estágios iniciais da interação parasito-hospedeiro que antecede a invasão (BELAUNZARÁN et al., 2007).

Em relação à síntese de prostanóides, *T. cruzi* sintetiza preferencialmente TXA2 (ASHTON et al., 2007), pequenas quantidades de PGF2 α e quantidades insignificantes de PGD2. A enzima PGF2 α sintase é semelhante à enzima amarela velha de levedura (“yeast old yellow enzyme”) (TcOYE) e resistente a AINEs como aspirina e indometacina (KABUTUTU et al., 2003).

A ação da lipoxina na inflamação do miocárdio e na resposta a infecção por *T. cruzi* não é bem compreendida. As únicas evidências que permitem extrapolar o seu papel na regulação da infecção por protozoários são os estudos dos mecanismos da lipoxina na infecção por *Toxoplasma gondii*. Animais que apresentavam a infecção por *T. gondii* e nocautes para a enzima lipooxigenase (5-LO), apresentaram um aumento significativo dos níveis de IL-12 e IFN- γ , enquanto que os animais onde ocorreu a administração da lipoxina A4 não se verificou o aumento. Os animais nocautes apresentaram também danos teciduais e maior mortalidade em relação aos controles selvagens (ALIBERTI; BAFICA, 2005; MACHADO; ALIBERTI, 2006; MUKHERJEE et al., 2011).

No modelo de infecção por *T. gondii* foi demonstrado que a lipoxina ativa dois receptores de células dendríticas (AhR -Receptor aril hidrocarbono e LXAR) e os efeitos da ativação são a expressão do supressor de citocinas sinalizante 2

(SOCS-2). Este supressor está relacionado com a modulação da inflamação na infecção por *T. gondii* (ALIBERTI; BAFICA, 2005; MACHADO; ALIBERTI, 2006; MUKHERJEE et al., 2011).

Wirth e Kierszenbaum em 1985 observaram a relação dos leucotrienos B₄ e C₄ na infecção por *T. cruzi* com a estimulação da fagocitose e conseqüentemente maior entrada do parasito em monócitos.

A inibição da enzima lipooxigenase pode ocorrer pela ação do ácido nordihidroguairético, que impede a formação de leucotrienos. O ácido nordihidroguarético também é inibitório para TGF- β (fator de transformação de crescimento beta) que desempenha diversas funções no controle da infecção por *T. cruzi* na progressão da doença de Chagas (DIAS, 1979; DIAS, 2006).

Os leucotrienos parecem exercer papel essencial no controle da carga parasitária tanto no sangue como no coração, no desenvolvimento do estresse oxidativo e na regulação da produção de óxido nítrico por macrófagos ativados na fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi* (BORGES et al., 2009; PANIS et al., 2011).

Entretanto, o estudo realizado por Pavanelli e colaboradores (2010) mostrou que a ausência de leucotrienos também parece exercer uma função protetora contra a infecção. Utilizando camundongos nocautes para 5-LO infectados com *T. cruzi*, encontraram uma parasitemia inicial mais elevada, porém uma melhora da taxa de sobrevivência dos camundongos, explicada pela redução dos níveis de citocinas e infiltrado inflamatório no coração, em comparação com os camundongos selvagens.

O tromboxano A₂ (TXA₂) é um potente vasoconstritor e está relacionado com muitas das sequelas provocadas da doença de Chagas como: inflamação dos órgãos e lesão isquêmica. A expressão TXA₂ promove citocinas pró-inflamatórias, quimioquinas, moléculas de adesão e a endotelina-1 que promovem lesão tecidual (ASHTON et al., 2007). Na infecção por *T. cruzi* em camundongos nocautes para o receptor TXA₂, apresentaram elevada inflamação no miocárdio e também na carga parasitária no tecido cardíaco (ASHTON et al., 2007).

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* o TXA₂ auxilia na sobrevivência do hospedeiro para que este faça a transição para a fase crônica (ASHTON et al 2007).

A PGE₂ tem efeito depressor na resposta humoral, inibindo a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos secretores de anticorpos e efeito inibitório nas células T (TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001).

As prostaglandinas são essenciais na modulação observada na infecção de *T. cruzi* tendo efeito imunossupressor (PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999).

Em um experimento analisando a ação inibitória de COX observou-se que atenuava a lipoperoxidação, isto é, a oxidação dos ácidos graxos nos eritrócitos no início (fase aguda) da infecção com *T. cruzi* (TATAKIHARA et al, 2008).

Estudos com camundongos infectados com *T. cruzi* (fase aguda) e tratados com a aspirina (inibidor generalista de COX-1 e COX-2) apresentaram maior parasitemia e mortalidade o que não foi observado na fase crônica. Na resposta ao *T. cruzi* a aspirina inibiu o aumento dos níveis de PGF₂ α e TXA₄. Foi relatado na infecção de *T. cruzi*, que a aspirina potencializou o efeito do nifurtimox e benzonidazol quando inibiu a síntese de prostaglandinas, aumentando a atividade do macrófago para eliminação do parasita (LÓPEZ-MUÑOZ, et al., 2010).

Foi demonstrado por Malvezi e colaboradores em 2014 que o tratamento de células H9c2 (cardiomiócitos de ratos) tanto com aspirina como celecoxibe aumentaram a expressão de iNOS, corroborando com a hipótese de que a inibição das enzimas COXs aumentaria os níveis de óxido nítrico recompondo a atividade antiparasitária dos macrófagos.

1.6.1 Aspirina e Células Dendríticas

A funcionalidade das DCs pode ser regulada pelos eicosanoides. Já foi descrita a participação de PGD₂, PGE₂ e LTC₄ na maturação, quimiotaxia e migração das DCs (LANDI, BABIUK, VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, 2011; POLOSO et al., 2013; ROBBIANI et al., 2000; SCANDELLA, et al., 2002; SCANDELLA, et al., 2004).

Além da citocina IL-12, outra citocina sofre influência dos eicosanoides. A expressão de TNF- α pelas DCs murinas pode ser inibida por PGE₂ (HARIZI; GUALDE, 2004; VASSILIOU; JING; GANEA, 2003).

Várias evidências *in vitro* e *in vivo* mostraram que ASA exerce profundos efeitos na maturação e diferenciação de células dendríticas através de seus mecanismos independentes de COX.

Hackstein e colaboradores (2001) demonstraram que o tratamento de DCs derivadas de medula óssea murina com aspirina inibiu a expressão de moléculas co-estimulatórias CD40, CD80, CD86 e MHC-II, além disso, o tratamento aumentou a atividade endocítica, característica de DC imatura, não inibiu a migração das DCs aos linfonodos secundários, porém, inibiu a estimulação da proliferação de células T virgens e a expressão de IL-12. De acordo com esses autores, tais efeitos foram causados pelo efeito inibitório de ASA sobre o NF- κ B.

Os efeitos de ASA encontrados por Hackstein e cols. (2001) também foram observados em DCs derivadas de monócitos humanos nos estudos realizados por Bufan e colaboradores (2009) e por Matasic; Dietz; Vuk-Pavlovic (2000).

A aspirina e ATIs são capazes de inibir a síntese de citocinas pró inflamatórias pelas DCs através da expressão do supressor da expressão de sinalização de citocinas 2 (SOCS-2) (MACHADO et al., 2008).

Kim e colaboradores (2010) trataram DCs derivadas de medula óssea murina com altas doses de aspirina por 18 horas e observaram que houve inibição da expressão tanto de MHC-I quanto de MHC-II e concluíram que o efeito anti-inflamatório da aspirina se dava pela inibição da apresentação de antígenos via MHC às células T.

Resumidamente, os efeitos supressivos acima descritos de ASA sobre o processo de maturação, bem como sobre a subsequente atividade imunoestimulante de DCs sugerem seu potencial imunorregulador sobre as respostas imunes inatas e adaptativas.

1.7 ADENILATO CICLASE

A adenilato ciclase (AC) é uma proteína integral de membrana composta por dois domínios transmembrana de seis alfas hélices cada um e dois domínios citosólicos denominados C1 e C2. Os domínios citosólicos constituem o centro catalítico da enzima, onde ocorre a conversão de ATP em adenosina-3'-5' monofosfato ou AMP cíclico (AMPc) (PIERRE et al., 2009; SADANA; DESSAUER, 2009; SUNAHARA; TAUSSIG, 2002).

A atividade da AC é regulada por receptores acoplados à proteína G (GPCRs). As proteínas G são heterotriméricas, compostas por subunidades α , β e γ ,

e classificadas de acordo com a estrutura e sequência da subunidade α , sendo que as três principais isoformas são a Gs (estimulatória), que ativa a AC, a Gi (inibitória) que inibe a atividade da AC e a Gq, envolvida na ativação da enzima fosfolipase C. Assim, a ativação de $G\alpha_i$ geralmente resulta em resposta pro-inflamatória, por inibir a produção de AMPc, enquanto que a ativação de $G\alpha_s$ geralmente contribui com uma resposta anti-inflamatória, por aumentar os níveis intracelulares de AMPc (revisado por LEANDER; FRIEDMAN, 2014).

As três subunidades da proteína G permanecem associadas no estado inativo, sendo tal associação essencial para a ativação estimulada por receptor. Em resposta ao ligante de GPCR, a subunidade $G\alpha_s$ catalisa a troca de GDP por GTP, assumindo a forma ativa dessa isoforma, desloca-se do dímero $\beta\gamma$ e ativa a AC, resultando no aumento do AMPc (CABRERA-VERA et al, 2003).

O aumento na concentração do AMPc intracelular resulta na ativação da proteína PKA (proteína quinase dependente de AMPc), que em seguida pode fosforilar diversas proteínas intracelulares que respondem ao estímulo gerado pelo ligante ao GPCR (CABRERA-VERA et al., 2003).

O dímero $\beta\gamma$ além de ancorar a fração α , está ligado aos processos de endocitose mediados por receptores. Lin e colaboradores (1998) demonstraram que o sequestro do dímero $\beta\gamma$ por subunidades α mutantes, resultou na diminuição da formação de vesículas revestidas por clatrina, proteína responsável pela formação das vesículas membranares nas células.

Existem nove isoformas da AC ligadas à membrana e uma isoforma solúvel, a AC10, em humanos. Tais isoformas diferem em suas propriedades farmacológicas. As isoformas AC-1, AC3 e AC8 são estimuladas pela via do cálcio/calmodulina. As isoformas AC2, AC4, AC5, AC6 e AC7 são estimuladas pelas subunidades do grupo das proteínas G. AC5 e AC6 são inibidas tanto pelo cálcio quanto pela proteína G inibitória $G\alpha_i$. AC9 não responde à forskolina, um potente ativador da AC (Revisado por EMERY; EIDEN; EIDEN, 2013).

O efeito ativador do diterpeno forskolina (FSK) resulta de sua ligação ao resíduo de leucina presente nos domínios catalíticos C1 e C2 da AC. AC9 apresenta uma mutação pontual nesse local, representado pela troca da leucina por uma tirosina, o que resulta na insensibilidade dessa isoforma à forskolina (YAN et al., 1998).

As nove isoformas são responsáveis pela produção do AMPc, porém a finalização da sinalização do AMPc é realizada por uma grande subfamília de enzimas, incluindo as mais de 40 variantes da enzima fosfodiesterase (PDE), a qual cataliza a degradação do AMPc em AMP (revisado por KLOTZ; KACHLER, 2016).

A concentração intracelular de AMPc é regulada pelo equilíbrio entre as ações das ACs e das PDEs, que estabelecem um “pool” local de AMPc próximo às moléculas efetoras. Essa compartimentalização do AMPc é possível pela ação das proteínas ancorantes de PKA (AKAPs) (Revisado por PIDOUX; TASKÉN, 2010).

Enquanto a atividade da AC é regulada pela $G\alpha$, a atividade da PDE é regulada pela enzima PKA, que sofre realimentação da $G\alpha$ (LEANDER; FRIEDMAN, 2014). A enzima PKA ativada pelo AMPc pode ativar o fator de transcrição da proteína ligada ao elemento de resposta do AMPc (CREB), resultando na transcrição de genes que possuem o elemento CRE, ou seja, os genes de IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e COX-2 (revisado por WEHBI; TASKÉN, 2016).

1.7.1 AMPc e células dendríticas

AMPc é conhecidamente um inibidor da ativação celular. Kambayashi, Wallin e Ljunggren (2001), Galgani e colaboradores (2004) e Ozegbe e colaboradores (2004), demonstraram que ativadores da produção de AMPc tais como FSK e PGE₂, inibem a ativação de DCs mediada por TLR e conseqüentemente sua função. Além disso, o AMPc é capaz de induzir a expressão de IL-10, conferindo um fenótipo tolerogênico nestas células (EIGLER et al, 1998; FUJITA et al., 2006; HAMMAD et al, 2007).

Schnurr e colaboradores (2005) demonstraram que FSK e PGE₂ aumentaram os níveis de AMPc através dos receptores EP2/EP4 (receptores ligados à Gs), resultando na diminuição dos níveis de IL-12 e aumento nos níveis de IL-23 em MdDCs.

Usando análogos de AMPc específicos para PKA ou para EPAC, Garay e colaboradores (2010) demonstraram que a ativação seletiva de PKA pelo AMPc induziu a maturação de DCs derivadas de monócitos humanos. Por outro lado, quando as duas vias, tanto a da PKA quanto a da EPAC foram ativadas

simultaneamente, a EPAC suprimiu o efeito da PKA, sugerindo que essas enzimas atuam regulando as funções das DCs.

1.7.2 AMPc e *T. cruzi*

A AC tripanosomatida (TcAC) localizada na membrana da região flagelar do parasito, apresenta uma pequena sequência homóloga com a AC humana mas uma estrutura completamente diferente. A TcAC tem um único domínio catalítico altamente conservado, um domínio transmembrana e um grande domínio N-terminal variável extracelular, estrutura que lembra o receptor de guanilato ciclase. O domínio catalítico não é estimulado pela forskolina (BAO et al, 2010; TAGOE; KALEJAIYE; DE KONING, 2015).

Tanto a TcAC quanto o AMPc estão envolvidos no processo de diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (D'ANGELO et al., 2002). Segundo Naula e Seebeck (2000), os níveis de AMPc aumentam de três a quatro vezes antes da diferenciação.

Além disso, o AMPc está envolvido na proliferação celular do *T. cruzi*. Níveis elevados de AMPc inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas (SANTOS; OLIVEIRA, 1988).

O *T. cruzi* possui a enzima PKA dependente de AMPc e sua inibição induz a morte celular de formas epimastigotas (BAO et al, 2008; GOLDENBERG; ÁVILA, 2011).

Existem quatro grupos de PDE nos tripanosomatídeos, estruturalmente semelhantes às PDEs humanas. A exata função das PDEs do parasito permanecem sob investigação e o que se conhece baseia-se em sua localização celular, no complexo vacúolo contrátil (CVC), uma organela essencial para a sua virulência, uma vez que controla a osmorregulação (DOCAMPO et al., 2011; LAXMAN; BEAVO, 2007; PROCÓPIO; BARROS; MORTARA, 1999; TALVANI et al., 2002).

O estudo sobre o papel da ciclooxygenase e do AMPc na infecção de células imunes humanas por *T. cruzi* pode propiciar novas perspectivas terapêuticas para a doença de Chagas.

2 JUSTIFICATIVA

As Dcs exercem a função de adaptadores da imunidade inata e adquirida e são também altamente susceptíveis às vias da COX e do AMPc. Portanto, a compreensão dos mecanismos de regulação exercidos pelas enzimas COX-1 e COX-2 e sua relação com a produção de AMPc nas DCs é de grande importância fisiopatológica, clínica e terapêutica para a doenças de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do nosso estudo foi verificar o papel das COX 1 e 2 e da adenilato ciclase na infecção de células do sangue humano periférico enriquecidas com células dendríticas por *Trypanosoma cruzi*. Para isto utilizamos fármacos inibidores de COX e inibidores e ativadores de adenilato ciclase.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos da inibição das COX 1 e 2 (COX-1 e COX-2) sobre a invasão de células do sangue humano periférico enriquecidas com DCs (DC-PBMC) por formas tripomastigotas de cultura (TMC);

Investigar os efeitos da inibição e da ativação da enzima AC sobre a invasão de DC-PBMC por TMC;

Avaliar os efeitos da inibição de COX-1 e COX-2 sobre a produção de citocinas e NO por DC-PBMC infectadas por *T. cruzi*;

Testar a hipótese de que o AMPc é um controlador da função tripanocida exercida por DC-PBMC e está sujeito às ações de mediadores lipídicos e do NO.

ARTIGO CIENTÍFICO



ORIGINAL RESEARCH
published: 25 October 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.02020



Response to *Trypanosoma cruzi* by Human Blood Cells Enriched with Dendritic Cells Is Controlled by Cyclooxygenase-2 Pathway

Sandra C. H. Lonien¹, Aparecida D. Malvezi¹, Helena T. Suzukawa¹, Lucy M. Yamauchi², Sueli F. Yamada-Ogatta², Luiz V. Rizzo², Juliano Bordignon⁴ and Phileno Pinge-Filho^{3*}

¹ Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, ² Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, ³ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil, ⁴ Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Dobora Docoto-Ricardo,
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Roberta Olmo Pinheiro,
Oswaldo Cruz Foundation, Brazil
Laura Noelia Cardot,
National University of Rio Cuarto,
Argentina

*Correspondence:

Phileno Pinge-Filho
pingefilho@uel.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 29 April 2017

Accepted: 03 October 2017

Published: 25 October 2017

Citation:

Lonien SCH, Malvezi AD,
Suzukawa HT, Yamauchi LM,
Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV,
Bordignon J and Pinge-Filho P (2017)
Response to *Trypanosoma cruzi* by
Human Blood Cells Enriched with
Dendritic Cells Is Controlled by
Cyclooxygenase-2 Pathway.
Front. Microbiol. 8:2020.
doi: 10.3389/fmicb.2017.02020

Chagas disease (Cd) or American human trypanosomiasis is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects ~7 million people, mostly in Latin America. The infective trypomastigote forms of the parasite can invade several human blood cell populations, including monocytes and dendritic cells (DC). Although these cells display a wide functional diversity, their interactions with *T. cruzi* via cyclooxygenase (COX) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) dependent pathways have not been analyzed. To exploiting this mechanism, DC-enriched peripheral human blood mononuclear cell populations (DC-PBMC) were used as our model. Our results showed that the treatment of these cell populations with celecoxib (CEL), a cyclooxygenase-2 selective inhibitor or SQ 22,536, an adenylate cyclase inhibitor, significantly caused marked inhibition of *T. cruzi* infection. In contrast, aspirin (ASA, a non-selective COX-1 and COX-2 inhibitor) treatment did not inhibit the infection of the cells by the parasite and was independent of nitric oxide (NO) production. The expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were similar on cells treated or not with both COX-inhibitors. The infection stimulated the release of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-10 production by infected cells. Treatment with ASA or CEL did not affect TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, and NO production by infected cells, but increased IL-1 β production by them. Our results suggest a key role of COX-2 and cAMP pathways in *T. cruzi* invasion process of human blood cells and these pathways may represent targets of new therapeutic options for Cd.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, cell invasion, human monocyte-derived dendritic cells, aspirin, celecoxib

INTRODUCTION

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease (Cd) that is transmitted to humans from the feces of infected triatomine bugs. Nearly 7 million people worldwide are infected with *T. cruzi*, mainly in Latin America where the disease is endemic in many countries. However, Cd is becoming a global health concern and this can be partly attributed to population mobility between Latin America and the rest of the world. In fact, cases of Cd have

already been detected in the United States, Canada, and in European and Western Pacific countries (Coura and Vinas, 2010; Bern, 2015; World Health Organization, 2017).

Cd is currently treated with either benznidazole or nifurtimox and these drugs have carcinogenic properties attributed to their active nitrofurans and nitroimidazole chemical groups, respectively (Wilkinson et al., 2011). This disease presents itself in two phases. An acute phase with nonspecific symptoms, which in most of the infected individuals is followed by an asymptomatic indeterminate chronic phase. About 5–40% of the cases develop a chronic symptomatic phase, after decades of acute infection, characterized by cardiac, digestive, or neurological conditions that may lead to death, with considerable psychological, social, and economic impacts (Machado et al., 2012; Dias et al., 2016).

Dendritic cells (DCs), macrophages, and natural killer (NK) cells respond to *T. cruzi* infection during the acute phase of Cd (Watanabe Costa et al., 2016). DCs modulate the immune response of the infected host and appear to depend on subtype and maturation level, influencing positively or negatively the development of the clinic forms of disease (Gil-Jaramillo et al., 2016).

The capacity of *T. cruzi* to infect and proliferate within human DC was revealed by Van Overtvelt et al. (1999), a biological event previously described for *Leishmania major* (Moll et al., 1995). *T. cruzi*-infected DCs reduces HLA-DR and CD40 expression and are not interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF)- α producer (Van Overtvelt et al., 1999). *T. cruzi* parasites also activates cord blood myeloid DCs, increasing the expression of CD40 and CD80 and promoting proliferation of CD8⁺ T cells and type-1-polarized response (Rodríguez et al., 2012a). It was also demonstrated that *T. cruzi* lysate elicits myeloid DCs independently of infection (Rodríguez et al., 2012b), a process recently revised by Gil-Jaramillo et al. (2016).

Microbe-induced microenvironments can influence DCs function also through indirect mechanisms, such as, inflammatory molecules or toxins (Palucka and Banchereau, 2002). For instance, prostaglandin E₂ (PGE₂) alters DCs function through PGE₂ receptors and can modulate DCs to induce Th2 responses (Kalinski et al., 1999). In addition, it was demonstrated that the treatment with the analog of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), dibutyryl cAMP, mimics the inhibitory effects induced by PGE₂ in DCs (Harizi et al., 2003).

The interaction between human DCs and *T. cruzi* as well as yours specific functions are not fully understood and are only beginning to be unraveled (Gil-Jaramillo et al., 2016). It has not been analyzed how human cells interact with *T. cruzi* via a cyclooxygenase (COX) and cAMP dependent pathways.

In our work, we sought to test the effects of inhibition of cyclooxygenase-1 (COX-1) and 2 (COX-2) in DC-enriched peripheral human blood cell (DC-PBMC) populations infected with *T. cruzi* (Tc II genotype, Y strain). We show that parasite invade, survive and proliferate inside the DC-PBMCs. By comparing the different treatments with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), we demonstrate that inhibition of COX-2 and cAMP impair *T. cruzi* entry into DC-PBMCs and this is paralleled by higher IL-1 β production by cells. Thus, COX-2 pathway and cAMP play an important role in the *T. cruzi* invasion process in human cells.

MATERIALS AND METHODS

Generation of DC-Enriched Peripheral Human Blood Cell (DC-PBMC) Populations

The study protocol was approved by the ethics committee of State University of Londrina (Process number: 5491/2012), National Committee for Ethics in Research (CONEP number: 5231). Blood samples (buffy coats) from healthy donors ($n = 6$) were collected at the University Hospital of State University of Londrina (UEL). All blood samples were collected in endotoxin-free heparinized tubes (BD Vacutainer® Sodium Heparin, 158 USP units) and processed within 1 h of collection.

Monocytes were isolated from PBMCs of healthy adult volunteers who were seronegative for Cd. Monocytes were isolated using lymphocyte separation medium (density 1.077 g/mL, Lonza, Walkersville, MD, USA) and gradient centrifugation at $750 \times g$ for 20 min. Human monocytes were selected from mononuclear cells via adherence. The isolated monocytes (CD14⁺ PBMCs) were cultured for 6–7 days in RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA) medium containing 100 ng/mL IL-4 and 50 ng/mL GM-CSF, 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 UI/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Gibco-BRL, Grand Island, NY), to be differentiated into immature monocyte-derived DCs (MoDCs) (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Figure S1 in Supplementary Material). The cells already showed CD11c⁺ expression and down-regulation of CD14 are consistent with DC phenotype, as assessed by flow cytometry using human mAb anti-CD11c (PE conjugated), human mAb anti-CD14 (FITC conjugated).

Trypanosoma cruzi

T. cruzi (Tc II genotype, Y strain; Zingales et al., 2009) were maintained by weekly intraperitoneal inoculations to Swiss mice. Trypomastigote-infected blood (washed and diluted in PBS) was used to inoculate subconfluent cultures of Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells (LLC-MK2, ATCC CCL-7; American Type Culture Collection, Rockville, MD), as described previously (Malvezi et al., 2014b). Non-internalized parasites were removed after 24 h and cultures were maintained in RPMI 1640 medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) containing 10% inactivated FBS (Gibco, BRL), 40 μ g/mL gentamicin (Gibco, BRL), 100 units penicillin/mL (Gibco, BRL), 100 μ g/mL streptomycin (Gibco, BRL). Free trypomastigote forms were detected in culture supernatants after 5 days post-infection.

Treatment and Viability of DC-PBMCs

Before *T. cruzi* infection, DC-PBMCs were incubated for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in the presence of different concentrations (0.312, 0.625, and 1.25 mM) of aspirin (ASA) or celecoxib (CEL) to evaluate the effects of the COX-inhibitors on trypomastigotes internalization (Malvezi et al., 2014a,b). The medium containing the inhibitors was removed and trypomastigotes were inoculated at a ratio of 5 parasites per cell. The system was incubated for 18–24 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Other treatments included incubation with PGE₂ (1 or 10 μ M; Lopez-Munoz et al., 2010), 20 μ M SQ 22,536 (Procopio et al., 1999), or 10 μ M Forskolin (Malvezi et al., 2014b).

for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. One set of culture plates was used to quantify cytokines and nitric oxide (NO). Expression levels of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were similar on untreated and treated DC-PBMC, and suggests that treatment with ASA or CEL was not provoked cell activation (Figure S2 in Supplementary Material).

The viability of the untreated and treated DC-PBMCs was evaluated by using the dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., USA) method, showing mitochondrial activity of viable cells. Cells were incubated with MTT (final concentration 0.5 mg/ml, 0.1%) at 37°C for 4 h. Supernatant was aspirated off and dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to solubilize the formazan crystals. The supernatants were transferred to a new plates and absorbance (A) was read using a Synergy HTX multiplate reader (Biotek, USA), at a test wavelength of 570 nm and reference wavelength of 630 nm. Percentage of cell viability was calculated using the formula: % cell viability = (mean A in test wells)/mean A in control wells × 100.

Infection of DC-PBMC by *T. cruzi*

After the different treatments, DC-PBMCs were washed three times with PBS, fixed with methanol, stained with Giemsa (Merck), and observed with a light microscope. The percentage of infected DC-PBMCs and the mean number of amastigotes per infected cell were recorded by direct counting of at least 200 cells after microscopic examination (Van Overtvelt et al., 1999). For determination of levels of cytokines and NO analyses, cells were not fixed but were processed accordingly.

Flow Cytometry

FITC-labeled anti-CD80, PE-labeled anti-CD86 antibodies were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Samples were analyzed using BD Accuri™ C5 Cytometer (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) and the data were analyzed using FlowJo version 10.0 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Inflammatory cytokines (IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, and IL-12p70 protein levels in a single sample) were determined in cell-free supernatants with the BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (Becton, Dickinson and Company).

Nitric Oxide (NO) Measurement

NO production was detected by measuring NO-derived nitrite accumulation level in the culture supernatants using Griess reagent (Sigma-Aldrich). Following 24 h-treatment of DC-PBMCs with COX-inhibitors [ASA or celecoxib (1.25 mM)] or SQ 22536 (20 μM), culture supernatants were transferred to a new 96-well microtiter plate and mixed with equal volume of Griess reagent. The plates were incubated at room temperature for 10 min and absorbance was determined at 540 nm. Nitrite concentrations were calculated using standard curve for sodium nitrite.

Statistical Analysis

Data were analyzed by parametric (one-way ANOVA with Tukey's post-test) and non-parametric (Kruskal-Wallis test, Dunn's post-test) statistical tests using Prism (version 5.0,

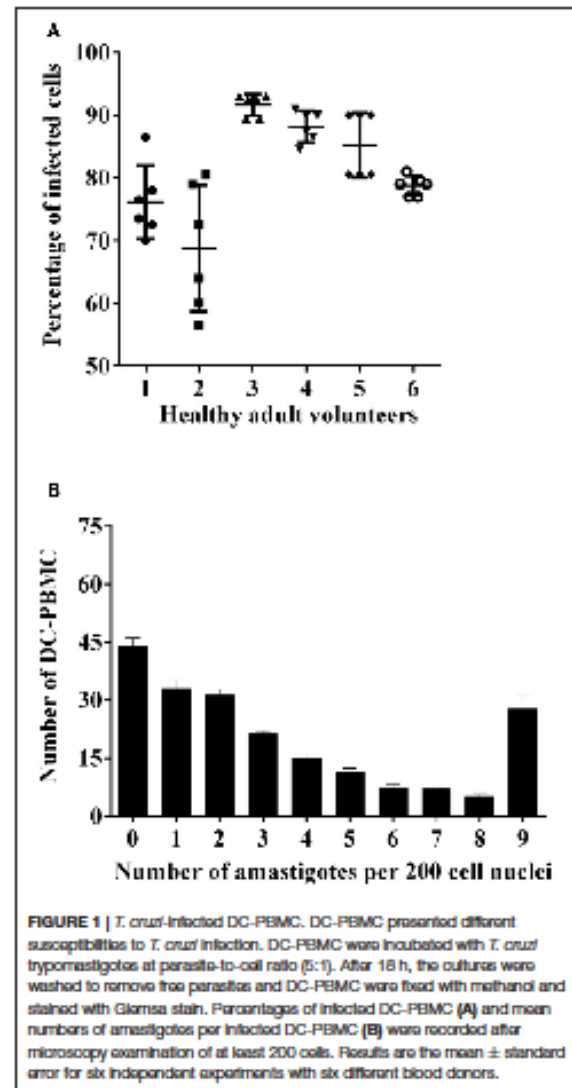


FIGURE 1 | *T. cruzi*-infected DC-PBMC. DC-PBMC presented different susceptibilities to *T. cruzi* infection. DC-PBMC were incubated with *T. cruzi* trypomastigotes at parasite-to-cell ratio (5:1). After 18 h, the cultures were washed to remove free parasites and DC-PBMC were fixed with methanol and stained with Giemsa stain. Percentages of infected DC-PBMC (A) and mean numbers of amastigotes per infected DC-PBMC (B) were recorded after microscopy examination of at least 200 cells. Results are the mean ± standard error for six independent experiments with six different blood donors.

GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values are presented as mean ± SEM. Results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Inhibition of Cyclooxygenase-2 Impairs *T. cruzi* Entry into DC-PBMC

In a first set of experiments, we analyzed the infection rate of DC-PBMCs incubated with *T. cruzi* trypomastigotes at parasite-to-cell ratio 5:1 for 18 h (Van Overtvelt et al., 1999). DC-PBMCs presented different susceptibilities to parasite infection, the percentage of infected cells ranged between 68.75% (volunteer

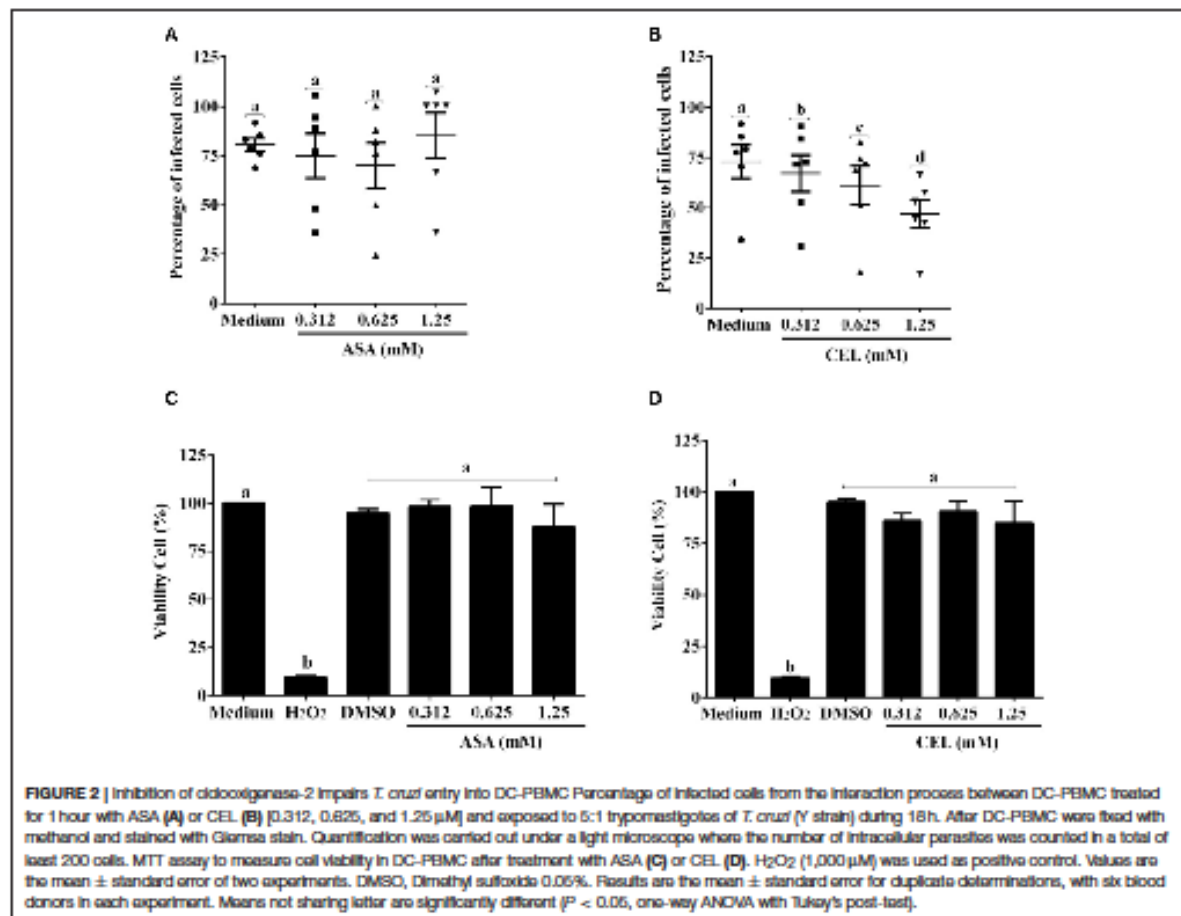
two) and 91.66% (volunteer tree), **Figure 1A**, with a mean of 80.64%. The mean number of amastigotes per infected DC-PBMCs ranged in the 18 h of culture (**Figure 1B**). For example, ~33 infected cells presented one amastigote/cell and ~28 infected cells presented nine amastigotes/cell recorded after microscopy examination of 200 cells (**Figure 1B**). These data indicated that *T. cruzi* invade, survive, and proliferate inside the DC-PBMCs.

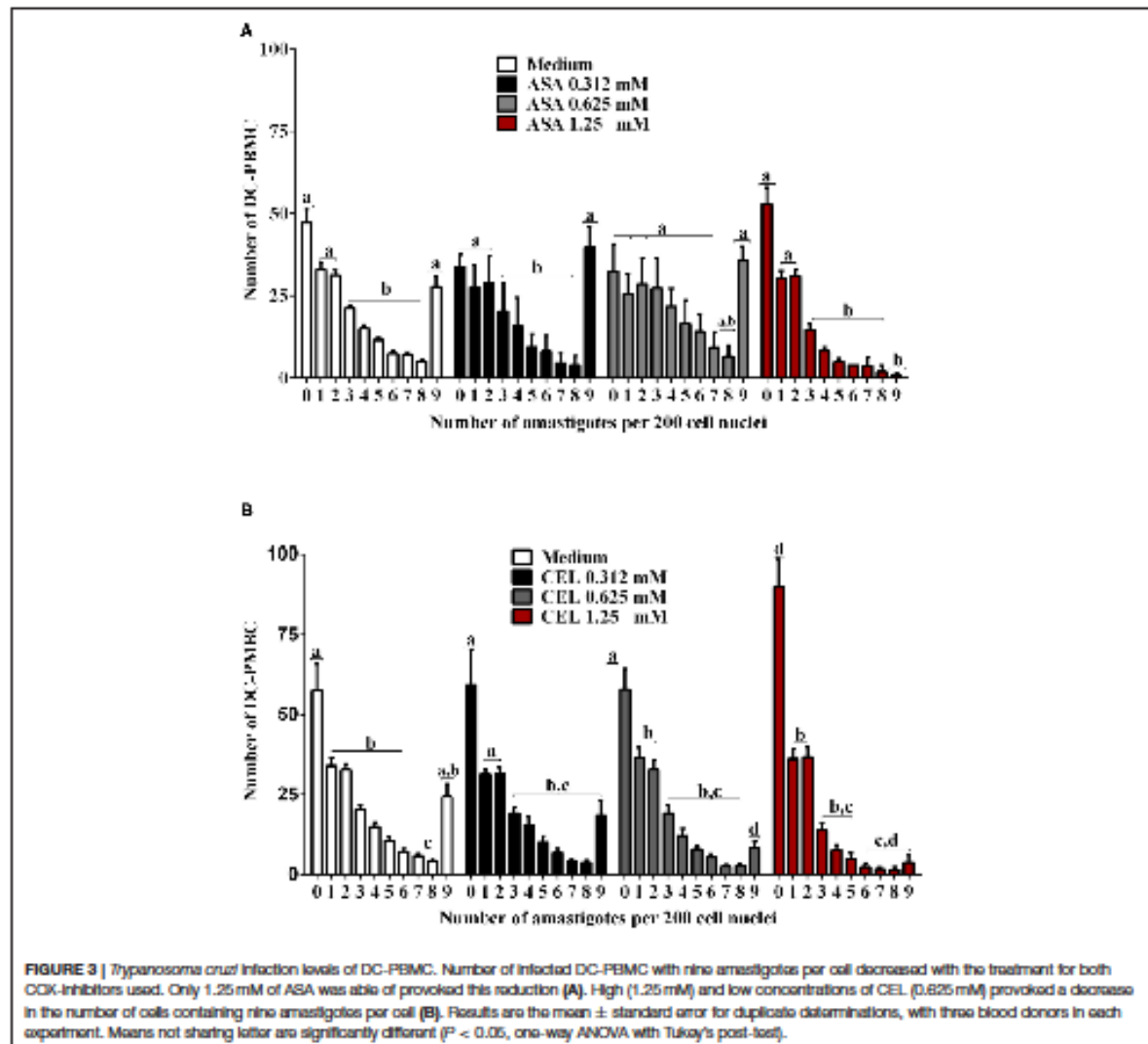
We next investigated whether the inhibition of COX-pathway with ASA (**Figure 2A**) or celecoxib (**Figure 2B**) would affect the infection rate of cells. First, we observed that treatments with COX-inhibitors did not interfere in DC-PBMC viability that was over 95% when analyzed by MTT reduction assay (**Figures 2C,D**). Only celecoxib markedly inhibited the *T. cruzi* entry into DC-PBMCs (**Figure 2B**). Interestingly, the mean number of infected DC-PBMC with nine amastigotes per cell decreased with the treatment for both inhibitors used (**Figure 3**). We observed that only 1.25 mM of ASA was able of provoked this reduction (**Figure 3A**). In contrast, both high (1.25 mM) and low concentrations of CEL (0.625 mM) provoked a decrease in the

number of cells containing nine amastigotes per cell (**Figure 3B**). When PGE₂ (1 or 10 μM) was added alone or in combination with ASA or CEL (**Figure 4**), the effect of CEL was inhibited, indicating an involvement of PGE₂ in the internalization of *T. cruzi* trypomastigotes into DC-PBMC. Taken together, these data indicated that PGE₂ synthesis inhibition using celecoxib (CEL) could improve human cells response against *T. cruzi* infection.

Modulation of Adenylyl Cyclase Activity Regulates DC-PBMC Invasion by *T. cruzi*

In the context of production of endogenous mediators, the immunomodulatory effects of PGE₂ are largely derived from the ability to increase intracellular cAMP levels. We further examined the effect of adenylyl cyclase inhibition by SQ 22536 (20 μM) on the entry of *T. cruzi* into DC-PBMC. Treatment with this inhibitor reduced *T. cruzi* entry into human DCs (**Figure 5A**). The mean number of infected DC-PBMC with nine amastigotes per cell decreased with the SQ 22536 treatment (**Figure 5B**). SQ 22536 did not show cytotoxicity





against uninfected DC-PBMC (data not shown). In addition, the activation of adenylyl cyclase induced by forskolin did not affect ASA treated-DC-PBMCs invasion by trypomastigotes from Y strain ($P > 0.05$, Figure 6A), but reverted CEL effects (Figure 6B, $P < 0.05$).

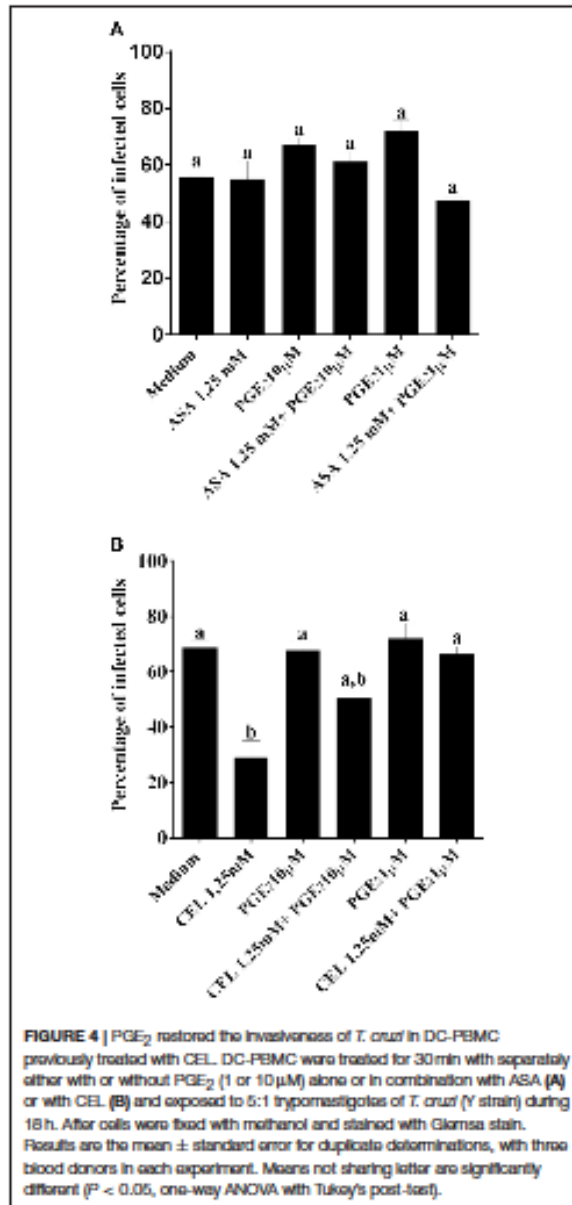
Effects of ASA and CEL on Innate Inflammatory Response of DC-PBMC Cells Infected with *T. cruzi*

We analyzed the effects of ASA and CEL on cytokines and NO production by infected DC-PBMCs. The entry of parasite into cells stimulated TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 releasing (Figure 7). Treatment with ASA or CEL did not affect TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 (Figure 7) neither NO production

by DC-PBMCs (Figure 8), but increased IL β production by them (Figures 7B,G). Levels of TNF- α were below the limit of detection of the assays in the absence of trypomastigotes (Figures 7A,F). Levels of IL-12 were also below the limit of detection in the presence and absence of trypomastigotes (data not shown).

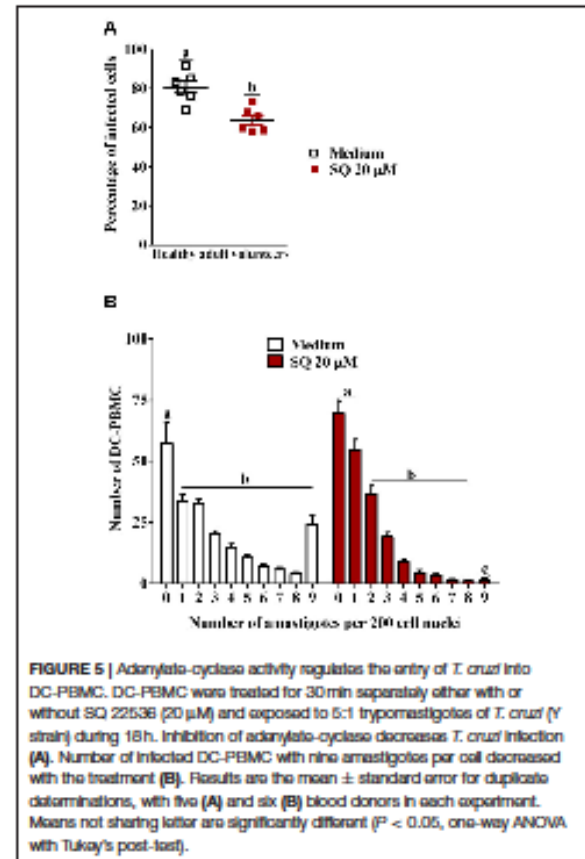
DISCUSSION

Recent evidence suggests that temporary inhibition of COX-2 activity can facilitate parasite survival in the early stage of interaction of *T. cruzi* with host cells (Moraes et al., 2015). In *T. cruzi*-infected cells, an inflammatory response is activated, in which COX-2 catalyzes rate-limiting steps in the arachidonic



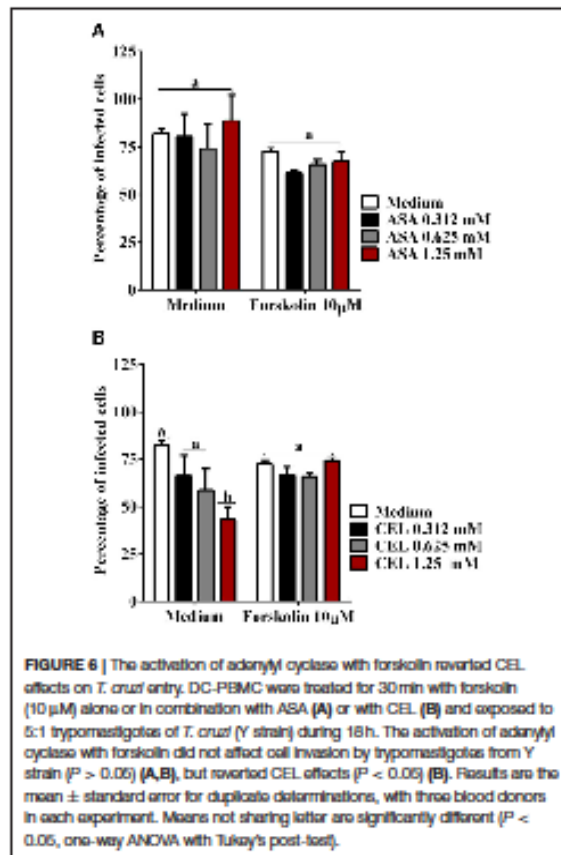
acid pathway (Moraes et al., 2015). However, the involvement of COX-mediated prostaglandin (PG) production in the entry of *T. cruzi* into human DCs is unknown.

PG can up-regulate the expression of NO synthase, stimulating NO production by macrophages during *T. cruzi* infection, leading to a highly oxidizing environment capable of killing the parasite (Pinge-Filho et al., 1999; Durand et al., 2009; Ganzinelli et al., 2009). In fact, there are at least two mechanisms of oxidative stress generation, which can be dependent or



independent of the balance of NO and PG production, and each mechanism being predominant according to the type of cell or mouse (Silva et al., 2003; Hideko Tatakahara et al., 2008; Ganzinelli et al., 2009). In addition, it was showed that phagocytosis of apoptotic T lymphocytes or neutrophils inhibits the parasite growth in macrophages in a manner dependent of TGF-β and PG. Hence, the NO content in macrophages decreases, the parasite proliferates (Freire-de-Lima et al., 2000; Lopes and DosReis, 2000; DosReis and Lopes, 2009; Maya et al., 2010). On the other hand, the inhibition of COX by indomethacin resulted in marked reduction of PGE₂ in macrophages (Abdalla et al., 2008) and spleen cells from *T. cruzi*-infected mice (Pinge-Filho et al., 1999). Interestingly, in the presence of *T. cruzi*, COX-2 enzyme exhibited an oscillatory activity pattern in H9c2 cells (an embryonic rat ventricular cell line) during the first 48 h post-infection, which correlated with the control of the pro-inflammatory environment in infected cells (Moraes et al., 2015).

Recent evidence suggests a role of COX-2 and PGE₂ signaling through EP-2 receptor in the development of myocarditis during acute *T. cruzi* infection in mice. In fact, it was showed a marked reduction in the cardiac inflammatory infiltration in knockout



mice deficient in the expression of COX-2 (COX-2^{-/-}) and the prostaglandin PGE₂ receptor EP-2 (EP-2^{-/-}) infected with *T. cruzi* compared to infected wild type animals (Guerrero et al., 2015).

The role of COX during *T. cruzi* infection in mouse has been studied using non-selective inhibitors of COX-1 and COX-2, as well as COX-2-selective inhibitors (NSAIDs), with controversial results (Machado et al., 2011). The use of ASA (weakly more selective for COX-1 than COX-2), CEL (COX-2-specific inhibitor) and indomethacin (non-selective inhibitor of COX-1 and COX-2) increases mortality and parasitemia (in peripheral blood and cardiac tissue), regardless of the mouse model or *T. cruzi* strain used (Celentano et al., 1995; Hideko Tatakijara et al., 2008). Moreover, administration of NSAIDs may enhance mortality in mice infected with non-lethal *T. cruzi* strain (Sterin-Borda et al., 1996), but other studies showed that inhibition of COX-2 activity decreases the level of parasitism (Freire-de-Lima et al., 2000). In addition, beneficial and adverse effects of COX inhibitors have been reported, depending on the phase of *T. cruzi* infection and mouse strain (Machado et al., 2000). More recently, it was showed that NSAIDs modulate innate inflammatory response and inhibit the entry of *T. cruzi*

into phagocytic cells (Lopez-Munoz et al., 2010; Molina-Berrios et al., 2013; Malvezi et al., 2014a) and non-phagocytic cells (Malvezi et al., 2014b) thereby controlling Cd progression (Machado et al., 2011; Mukherjee et al., 2011; Molina-Berrios et al., 2013).

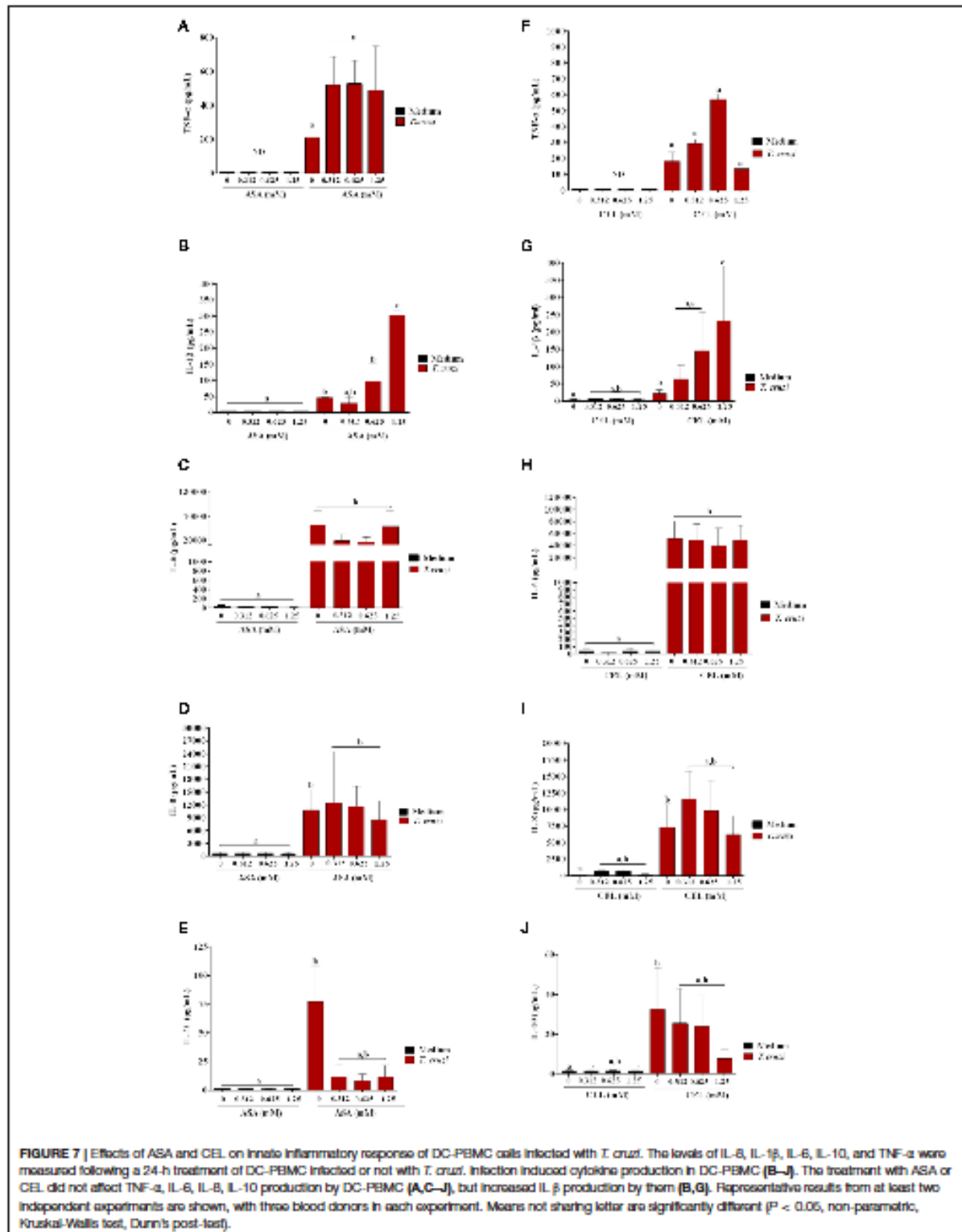
Our data clearly show that the treatment of DC-PBMCs with CEL significantly inhibits internalization of trypomastigote forms of *T. cruzi*, and this event may be related with the inhibition of PGE₂ synthesis. Our observations on DC-PBMCs infection corroborate with those obtained in experiments with human and murine cells infected by *T. cruzi* (de Araujo-Jorge, 1989; Van Overtvelt et al., 1999). These results strongly support that COX-2 pathway plays a fundamental role in parasite invasion of host cells (Lopez-Munoz et al., 2010; Malvezi et al., 2014a,b).

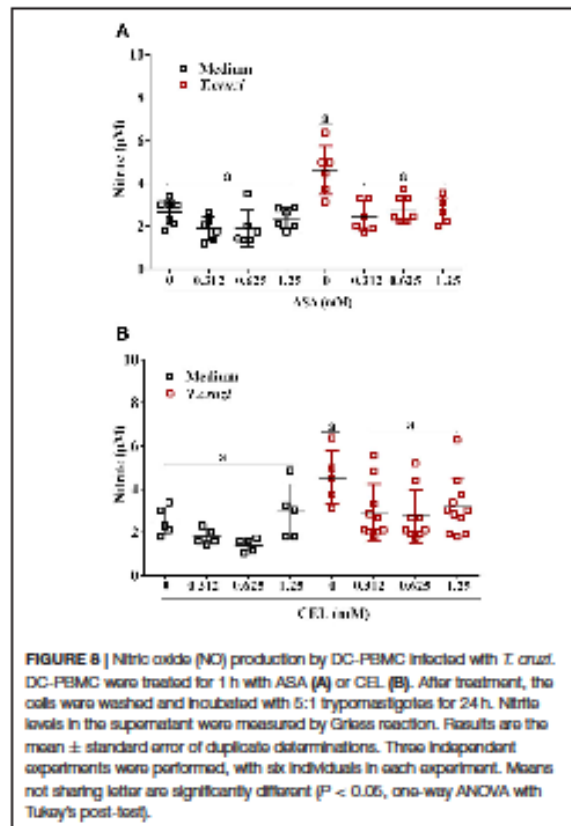
Invasion by *T. cruzi* may trigger cAMP releasing in host cells (Rodriguez et al., 1999; Caler et al., 2000). Here, we observed that the treatment of DC-PBMCs with SQ 22536 (adenylate-cyclase inhibitor) reduced parasite entry into these cells and prevented the inhibitory effect of CEL on *T. cruzi* infection. Although not tested explicitly, we speculate that PGE₂ inhibition by CEL leads to a reduction in intracellular cAMP (Saini et al., 2003), accounting for the anti-*T. cruzi* activities of CEL observed in this study. In accordance, we showed that treatment of DC-PBMCs with CEL but not with ASA in a combination with forskolin (activator of adenylyl cyclase) restored the infectivity of trypomastigotes for DC-PBMCs.

It has been described that *T. cruzi* can modulate cytokines and co-stimulatory molecules expression in DCs suggesting altered functions of these cells during infection, which might contribute controversially to both parasite immune evasion and an increased immune activation (Van Overtvelt et al., 1999; Gil-Jaramillo et al., 2016). Our observation that *T. cruzi* infection stimulated the release of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 (involved in the control of intracellular infection) are in contrast with previous report showing no increase in the basal production of cytokines by human DCs infected with *T. cruzi* (Van Overtvelt et al., 1999). However, this effect presents similarity to infection by other pathogens, which induce DCs activation (Henderson et al., 1997; Gorak et al., 1998; Yamamoto et al., 1998; Amorim et al., 2016).

A small family of type1 glycosylphospholipids (GIPLs) is abundant in *T. cruzi* cell surface. Such molecules seem to have immunoregulatory functions (Brodszyn et al., 2002; Medeiros et al., 2007), as the inhibition of co-stimulatory molecules HLA-DR, CD83, CD86, CD80, and CD40 expression on DC surface, representing an evasion strategy of *T. cruzi* (Gil-Jaramillo et al., 2016). Our results indicate that the treatment with ASA or CEL did not promote any up-regulation of co-stimulatory molecules (CD80 and CD86).

In summary, our data show that trypomastigotes internalized by DC-PBMCs are able to survive intracellularly during infection, leading to high levels of inflammatory response. Alterations in PGE₂ and cAMP levels can profoundly influence the immune functions of human DCs and alter the course of *in vitro* *T. cruzi* infection. This study strengthens that COX-2 pathway plays a fundamental role in the process of *T. cruzi* invasion. So, a





deeper understanding of the mechanism of action of NSAIDs may indicate new targets for the control of Cd.

REFERENCES

- Abdalla, G. K., Faria, G. E., Silva, K. T., Castro, E. C., Reis, M. A., and Michelin, M. A. (2008). *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.* 118, 514–521. doi: 10.1016/j.exppara.2007.11.003
- Amorim, K. N., Chagas, D. C., Sulczewski, F. B., and Boscardin, S. B. (2016). Dendritic cells and their multiple roles during malaria infection. *J. Immunol. Res.* 2016:2926436. doi: 10.1155/2016/2926436
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 1882. doi: 10.1056/NEJMr1410150
- Brodskyn, C., Patricio, J., Oliveira, R., Lobo, L., Arnoldt, A., Mendonça-Previato, L., et al. (2002). Glycosylphosphatidylinositol from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect. Immun.* 70, 3736–3743. doi: 10.1128/IAI70.7.3736-3743.2002
- Caler, E. V., Morley, R. E., Burleigh, B. A., and Andrews, N. W. (2000). Dual role of signaling pathways leading to Ca^{2+} and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68, 6602–6610. doi: 10.1128/IAI68.12.6602-6610.2000
- Celentano, A. M., Gorelik, G., Solana, M. E., Sterin-Borda, L., Borda, E., and Gonzalez Cappa, S. M. (1995). PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins* 49, 141–153. doi: 10.1016/0090-6980(95)00002-B
- Coura, J. R., and Vinas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6–S7. doi: 10.1038/nature09221
- de Araujo-Jorge, T. C. (1989). The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 441–462. doi: 10.1590/S0074-02761989000400001
- Dias, J. C., Ramos, A. N. Jr., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanat-Yasuda, M. A., Coura, J. R., et al. (2016). 2nd Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49(Suppl. 1), 3–60. doi: 10.1590/0037-8682-0505-2016
- DosReis, G. A., and Lopes, M. F. (2009). The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(Suppl. 1), 259–262. doi: 10.1590/S0074-02762009000900033
- Durand, J. L., Mukherjee, S., Commodari, F., De Souza, A. P., Zhao, D., Machado, F. S., et al. (2009). Role of NO synthase in the development of *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyopathy in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 782–787. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.782
- Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., de Mello, F. G., et al. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199–203. doi: 10.1038/35003208

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SL, LR, LY, SY, and PP contributed to the conception of the study, JB, PP, and SY designed the study. AM, SY, HS, and PP carried out experiments, AM, HS, JB, and SY analyzed the data. SY and PP wrote the main manuscript text, JB and PP prepared manuscript figures. All authors reviewed the manuscript, contributed to the discussion and approved the final version.

FUNDING

This work was funded by CNPq (Edital Universal 14/11, grant numbers: 474792/2011, 306497/2013-2015), by Fundação Araucária (grant number 419). SL was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). HS was supported by PROIC-Fellowship by CNPq. LR and PP are recipients of personal fellowships from CNPq. JB received research fellowship from Fundação Araucária (grant number 658/2014-24.718).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02020/full#supplementary-material>

Figure S1 | Characterization of DC-PBMC by CD11c and CD14 Cell surface staining. (A) Representative example of isotypic control and CD11c/CD14 labeled cells. (B) Representative graphs showing the percentage of CD11c⁺/CD14⁺ and CD11c⁺/CD14⁻. Results are the mean and standard error (SE%) of four experiments with three independent donors.

Figure S2 | Treatment with aspirin (ASA) or colicoxib (CEL) does not induce the activation of DC-PBMC. Expression levels of activation markers (CD86 and CD80) on uninfected DC-PBMC and treated with ASA or CEL. (A) Representative graphs showing the mean and standard error (SE%) of four experiments with three independent donors. (B) No statistically significant differences (one-way ANOVA with Tukey's post-test) were observed between any of the groups analyzed.

- Ganzinelli, S., Borda, E., Joensen, L., and Stern-Borda, L. (2009). Chagasic antibodies induce cardiac COX-2/iNOS mRNA expression with PGE2/NO production. *Int. J. Cardiol.* 134, 212–223. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.02.008
- Gil-Jaramillo, N., Motta, F. N., Favali, C. B., Bastos, I. M., and Santana, J. M. (2016). Dendritic cells: a double-edged sword in immune responses during Chagas disease. *Front. Microbiol.* 7:1076. doi: 10.3389/fmicb.2016.01076
- Gorak, P. M., Engwerda, C. R., and Kaye, P. M. (1998). Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* 28, 687–695. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<687::AID-IMMU687>3.0.CO;2-N
- Guerrero, N. A., Camacho, M., Vila, L., Itiguer, M. A., Chillon-Martins, C., Cuervo, H., et al. (2015). Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 signaling through prostaglandin receptor ep-2 favor the development of Myocarditis during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0004025. doi: 10.1371/journal.pntd.0004025
- Hartzel, H., Grosset, C., and Gualde, N. (2003). Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *J. Leukoc. Biol.* 73, 756–763. doi: 10.1189/jlb.1002483
- Henderson, R. A., Watkins, S. C., and Flynn, J. L. (1997). Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 159, 635–643.
- Hideo Tatakishara, V. L., Cecchini, R., Borges, C. L., Malvezzi, A. D., Graca-de Souza, V. K., Yamada-Ogata, S. F., et al. (2008). Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 47–58. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00340.x
- Kalniski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20, 561–567. doi: 10.1016/S0167-5699(99)01547-9
- Lopes, M. F., and DosReis, G. A. (2000). Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. *Apoptosis* 5, 221–224. doi: 10.1023/A:1009648311490
- Lopez-Munoz, R., Faunder, M., Klein, S., Escanilla, S., Torres, G., Lee-Liu, D., et al. (2010). *Trypanosoma cruzi*: in vitro effect of aspirin with nifurtimox and benzimidazole. *Exp. Parasitol.* 124, 167–171. doi: 10.1016/j.exppara.2009.09.005
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Tetzela, M. M., Factor, S. M., et al. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.* 34, 753–770. doi: 10.1007/s00281-012-0351-7
- Machado, F. S., Martins, G. A., Aliberti, J. C., Mestriner, F. L., Cunha, F. Q., and Silva, J. S. (2000). *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102, 3003–3008. doi: 10.1161/01.CIR.102.24.3003
- Machado, F. S., Mukherjee, S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., and Ashton, A. W. (2011). Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv. Parasitol.* 76, 1–31. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3
- Malvezzi, A. D., da Silva, R. V., Panis, C., Yamauchi, L. M., Lovo-Martins, M. I., Zanlaqui, N. G., et al. (2014a). Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. *Mediators Inflamm.* 2014:580919. doi: 10.1155/2014/580919
- Malvezzi, A. D., Panis, C., da Silva, R. V., Carvalho de Freitas, R., Martins, M. I., Tatakishara, V. L., et al. (2014b). Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry in cardiac cell and promotes differential modulation of inflammatory response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6157–6164. doi: 10.1128/AAC.02752-14
- Maya, J. D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., Lopez-Munoz, R., and Morello, A. (2010). Chagas disease: present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* 43, 323–331. doi: 10.4067/S0716-97602010000300009
- Medeiros, M. M., Petzoto, J. R., Oliveira, A. C., Cardilo-Reis, L., Koatz, V. L., Van Kaer, L., et al. (2007). Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Leukoc. Biol.* 82, 488–496. doi: 10.1189/jlb.0706478
- Molina-Berrios, A., Campos-Estrada, C., Henriquez, N., Faunder, M., Torres, G., Castillo, C., et al. (2013). Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A(4)-mediated effect. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2173. doi: 10.1371/journal.pntd.0002173
- Moll, H., Flohe, S., and Rollinghoff, M. (1995). Dendritic cells in *Leishmania* major-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur. J. Immunol.* 25, 693–699. doi: 10.1002/ejtl.1830250310
- Moraes, K. C., Dimtz, I. F., and Bahia, M. T. (2015). Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 181–191. doi: 10.1590/0074-02760140311
- Mukherjee, S., Machado, F. S., Huang, H., Oz, H. S., Jelicks, L. A., Prado, C. M., et al. (2011). Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS ONE* 6:e16959. doi: 10.1371/journal.pone.0016959
- Palucka, K., and Banchereau, J. (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 420–431. doi: 10.1016/S0952-7915(02)00365-5
- Pinge-Filho, P., Tadokoro, C. E., and Abrahamsohn, I. A. (1999). Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.* 193, 90–98. doi: 10.1006/cimm.1999.1463
- Procopio, D. O., Tetzela, M. M., Camargo, M. M., Travassos, L. R., Ferguson, M. A., Almeida, I. C., et al. (1999). Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF- α and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1195–1205. doi: 10.1038/sj.bjp.0702624
- Rodriguez, A., Martinez, I., Chung, A., Berlot, C. H., and Andrews, N. W. (1999). cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 16754–16759. doi: 10.1074/jbc.274.24.16754
- Rodriguez, P., Carlier, Y., and Truysens, C. (2012a). Activation of cord blood myeloid dendritic cells by *Trypanosoma cruzi* and parasite-specific antibodies, proliferation of CD8⁺ T cells, and production of IFN- γ . *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 157–169. doi: 10.1007/s00430-011-0217-y
- Rodriguez, P., Carlier, Y., and Truysens, C. (2012b). *Trypanosoma cruzi* activates cord blood myeloid dendritic cells independently of cell infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 287–296. doi: 10.1007/s00430-012-0230-9
- Sami, S. S., Gessell-Lee, D. L., and Peterson, J. W. (2003). The cox-2-specific inhibitor celecoxib inhibits adenylyl cyclase. *Inflammation* 27, 79–88. doi: 10.1023/A:1023226616526
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118. doi: 10.1084/jem.179.4.1109
- Silva, J. S., Machado, F. S., and Martins, G. A. (2003). The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front. Biosci.* 8, s314–s325. doi: 10.2741/1012
- Stern-Borda, L., Gorelik, G., Goren, N., Cappa, S. G., Celentano, A. M., and Borda, E. (1996). Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81, 122–128. doi: 10.1006/clm.1996.0167
- Van Overvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., de Vos, L., Goldman, M., et al. (1999). *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect. Immun.* 67, 4033–4040.
- Watanabe Costa, R., da Silveira, J. F., and Bahia, D. (2016). Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Front. Microbiol.* 7:388. doi: 10.3389/fmicb.2016.00388
- Wilkinson, S. B., Bot, C., Kelly, J. M., and Hall, B. S. (2011). Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2072–2084. doi: 10.2174/156802611796575894

- World Health Organization (2017). *World Health Organization: Chagas Disease*. Available online at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- Yamamoto, K., Akbar, S. M., Masumoto, T., and Onji, M. (1998). Increased nitric oxide (NO) production by antigen-presenting dendritic cells is responsible for low allogeneic mixed leucocyte reaction (MLR) in primary biliary cirrhosis (PBC). *Clin. Exp. Immunol.* 114, 94–101. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00696.x
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., et al. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054. doi: 10.1590/S0074-02762009000700021

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Lonten, Malvest, Suzukiwara, Yamauchi, Yamada-Ogata, Rizzo, Bordignon and Pinge-Filho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Figure S1

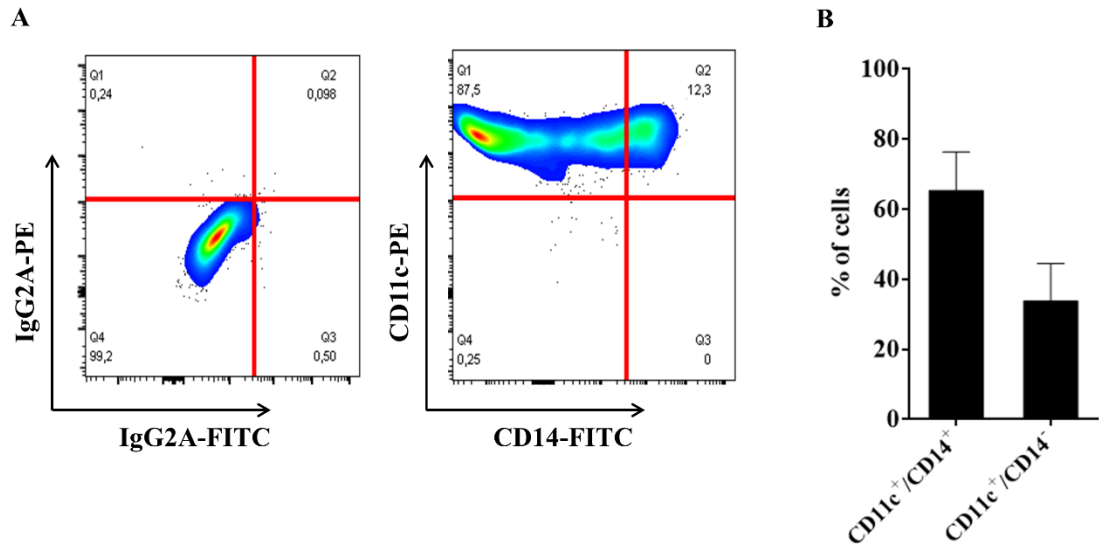
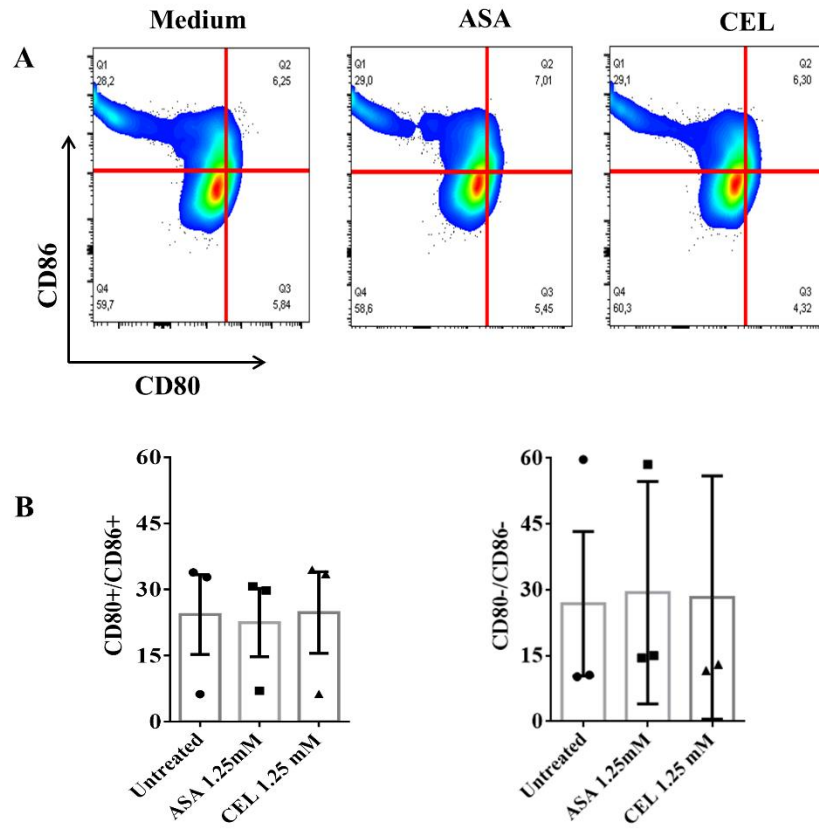


Figure S2



CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostram que tripomastigotas internalizados por DC-PBMCs são capazes de sobreviver intracelularmente durante a infecção levando a uma resposta inflamatória.

A modulação farmacológica dos níveis de PGE₂ e AMPc pode influenciar as funções imunológicas das DCs humanas e alterar o curso da infecção *in vitro* por *T. cruzi*.

Este estudo fortalece a ideia de que a via da COX-2 desempenha um papel fundamental no processo de invasão do *T. cruzi*.

Assim, uma compreensão mais profunda do mecanismo de ação dos AINEs pode fornecer pistas para um novo alvo terapêutico para a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, 84: 231-244, 1996.
- ABUHAB, A.; TRINDADE, E.; AULICINO, G. B.; FUJII, S.; BOCCHI, E. A.; BACAL, F. Chagas' cardiomyopathy: The economic burden of an expensive and neglected disease. **Int. J. Cardiol.**, 168 (3): 2375-80, 2013.
- AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. Encontro discute lacunas e desafios para a doença de Chagas na atualidade. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/encontro-discute-lacunas-e-desafios-para-doenca-de-chagas-na-atualidade>. Acesso em: 12 set. 2017.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 124 (4): 783-801, 2006.
- ALBA SOTO C. D.; MIRKIN G. A.; SOLANA M. E.; GONZÁLEZ-CAPPA S. M. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect. Immun.**, 71(3):1194-9, 2003.
- ALBA SOTO, C. D. ; SOLANA, M. E.; PONCINI, C. V.; PINO-MARTINEZ, A. M.; TEKIEL, V.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M. Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, 28 (46): 7407–7413, 2010.
- ALEXANDER, J. Effect of the antiphagocytic agent cytochalasin B on macrophages invasion by *Leishmania mexicana* promastigotes and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J. Protozool.**, 22: 237-240, 1975.
- ALIBERTI, J.; BAFICA, A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 73 (3-4): 283-8, 2005.
- ALLOZA, I.; BAXTER, A.; CHEN, Q.; MATTHIESEN, R.; VANDENBROEK, K. Celecoxib inhibits interleukin-12 alpha and beta2 folding and secretion by a novel COX2-independent mechanism involving chaperones of the endoplasmic reticulum. **Mol. Pharmacol.**, 69 (5): 1579-87, 2006.
- ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **J. Biol. Chem.**, 286: 6627-6640, 2011.

AMORIM, D. S.; GODOY, R. A.; MANÇO, J. C.; TANAKA, A.; GALLO, L. Effects of acute elevation in blood pressure and of atropine on heart rate in Chagas' disease. **Circulation**, 38 (2): 289-294, 1968.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: New global challenges for an old neglected disease. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, 8 (7): e3010, 2014.

ANDRADE, J. P.; MARIN-NETO, J. A.; DE PAOLA, A. A. V.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G. M. M.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; ALMEIDA, D. R.; FRAGATA FILHO, A. A.; MOREIRA, M. C. V.; XAVIER, S. S.; DE OLIVEIRA JUNIOR, W. A.; DIAS, J. C. P. I Latin American Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas' Heart Disease. Executive Summary. **Arq. Bras. Cardiol.**, 96 (6): 434-442, 2011.

ANDRADE, S. G. Patologia experimental da doença de Chagas. **In:** BRENER, Z.; ANDRADE Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Eds.). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 177-200, 2000.

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

ARAÚJO-JORGE, T. C.; BARBOSA, H. S.; MEIRELES, M. N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15- year study. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, 87 (Supl 5): 43-56, 1992.

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.; SHERER, P. E.; CAPRA, V.; COFFMAN, T. M.; SERHAN, C. N.; GOTLINGER, K.; WU, K. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, 204 (4): 929–940, 2007.

BAO, Y.; WEISS, L. M.; BRAUNSTEIN, V. L.; HUANG, H. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, 76 (10): 4757-4763, 2008.

BAO, Y.; WEISS, L. M.; MA, Y. F.; KAHN, S.; HUANG, H. Protein kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of transsialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, 12, 716-726, 2010.

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

BARRIAS, E. S.; DUTRA, J. M.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 363: 828-834, 2007.

BARTHOLOMEU, D. C.; ROPERT, C.; MELO, M. B.; PARROCHE, P.; JUNQUEIRA, C. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; SIROIS, C.; KASPERKOVITZ, P.; KNETTER, C. F.; LIEN, E.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T.. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 181 (2):1333-1344, 2008.

BEHR, C. A.; HESKETH, A. J.; BARLOW, M.; GLICK, R. D.; SYMONS, M.; STEINBERG, B. M.; SOFFER, S. Z. Celecoxib inhibits Ewing sarcoma cell migration via actin modulation. **J. Surg. Res.**, 198 (2): 424-33, 2015.

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

BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid mediators in inflammation. **Microbiol. Spectr.**, 4 (6): MCHD-0035, 2016.

BENVENUTI, L. A.; ROGGÉRIO, A.; FREITAS, H. F. G.; MANSUR, A. J.; FIORELLI, A.; HIGUCHI, M. L. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 102 (6): 481-487, 2008.

BERN, C. Chagas' Disease. **New Engl. J. Med.**, 373 (5): 456-66, 2015.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis**, 49: e52–54, 2009.

BESTETTI, R. B.; OTAVIANO, A. P.; CARDINALLI-NETO, A.; DA ROCHA, B. F.; THEODOROPOULOS, T. A. D.; CORDEIRO, J. A. Effects of B-blockers on outcome of patients with Chagas' cardiomyopathy with chronic heart failure. **Int. J. Cardiol.**, 151 (2): 205-208, 2011.

BESTETTI, R. B.; THEODOROPOULOS, T. A. D.; CARDINALLI-NETO, A.; CURY, P. M. Treatment of chronic systolic heart failure secondary to Chagas heart disease in the current era of heart failure therapy. **Am. Heart J.**, 156 (3): 422-430, 2008.

BJERCKE, S.; GAUDERNACK, G. Dendritic cells and monocytes as accessory cells in T-cell responses in man. II. Function as antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.**, 21: 501-8, 1985.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of antigen processing. **Annu. Rev. Immunol.** 31, 443-473, 2013.

BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Thorac. Surg.**, 71: 1833-8, 2001.

BORGES, C. L.; CECCHINI, R.; TATAKIHARA, V. L. H.; MALVEZI, A. D.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. **Immunol. Lett.**, 123 (1): 38-45, 2009.

BOTONI, F. A.; POOLE-WILSON, P. A.; RIBEIRO, A. L.; OKONKO, D. O.; OLIVEIRA, B. M. R.; PINTO, A. S.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA JR, A. L.; REIS, A. M.; DANTAS, J. B. P.; FERREIRA, C. S.; TAVARES JR, W. C.; ROCHA, M. O. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. **Am. Heart J.**, 153 (4): 544.e1-544.e8, 2007.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **J. Thermal Biol.**, 31: 208-219, 2006a.

_____. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **J. Physiol. Pharmacol.**, 57 suppl 5, 113-124, 2006b.

_____. Vane's discovery of the mechanism of action aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. **Pharmacol. Rep.**, 62: 518-525, 2010.

BOUSSIOTIS, V. A.; FREEMAN, G. J.; GRIBBEN, J.; NADLER, L. The role of B7-1/B7-2: CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. **Immunol. Rev.**, 153: 5-26, 1996.

BREYER, R. M.; BAGDASSARIAN, C. K. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 141: 661-90, 2001.

BUFAN, B.; MOJSILOVIC', S.; VUCICEVIC', D.; VUCEVIC', D.; VASILIJIC', S.; BALINT, B.; COLIC', M. Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. **Int. Immunopharmacol.**, 9 (7-8): 910-917, 2009.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-k-Da alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, 270: 5172-5180, 1995.

CABRERA-VERA, T. M.; VANHAUWE, J.; THOMAS, T. O.; MEDKOVA, M.; PREININGER, A.; MAZZONI, M. R.; HAMM, H. E. Insights into G protein structure, function, and regulation. **Endocr. Rev.**, 24: 765–781, 2003.

CAETANO, B. C.; CARMO, B. B.; MELO, M. B.; CERNY, A.; DOS SANTOS, S.; BARTHOLOMEU, D. C.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for Toll-Like Receptor 7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 187(4): 1903–1911, 2011.

CALDERÓN, J.; MAGANTO-GARCIA, E.; PUNZÓN, C.; CARRIÓN, J.; TERHORST, C.; FRESNO, M. The receptor Slamf1 on the surface of myeloid lineage cells controls susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi*. **PloS Pathog.**, 8: e1002799, 2012.

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

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

CAMARGO, R.; FARIA, L. O.; KLOSS, A.; FAVALI, C. B. F.; KUCKELKORN, U.; KLOETZEL, P. M.; DE SÁ, C. M.; LIMA, B. D. *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. **Plos One** 9: e95977, 2014.

CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. **Mediators Inflamm.**, 13(3): 139-43, 2004.

CAMPOS, V. L.; MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CARVALHO, I. *Trypanosoma cruzi* invasion into host cells: a complex molecular targets interplay. **Mini Rev. Med. Chem.**, 16 (13): 1084-97, 2016.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J.L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Front. Immunol.**, 6: 659, 2016.

CASTILLO-RIQUELME, M.; GUHL, F.; TURRIAGO, B.; PINTO, N.; ROSAS, F.; MARTÍNEZ, M. F.; FOX-RUSHBY, J.; DAVIES, C.; CAMPBELL-LENDRUM. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, 2 (11): e336, 2008.

CHAUSSABEL, D.; PAJAK, B.; VERCRUYSSSE, V.; BISSEYÉ, C.; GARZÉ, V.; HABIB, M.; GOLDMAN, M.; MOSER, M.; VRAY, B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Lab. Invest.**, 83 (9):1373-1382, 2003.

CHIBA, A.; MIZUNO, M.; TOMI, C.; TAJIMA, R.; ALLOZA, I.; DI PENTA, A.; YAMAMURA, T.; VANDENBROECK, K.; MIYAKE, S. A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. **Arthritis Research & Therapy** 14: R9, 2012.

CHIN, E.; ARABOV, Y.; MANDEL, E. D. A guide for screening, diagnosing, and managing Chagas disease in the United States. **JAAPA**, 26 (9): 16-22, 2013.

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

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

COLEMAN, R. A.; EGLIN, R. M.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S.; SHIMIZU, T.; SMITH, W. L.; DAHLÉN, S. E.; DRAZEN, J. M.; GARDINER, P. J.; JACKSON, W. T.; Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature **Adv. Prostaglandin. Thromboxane Leukot. Res.**, 23: 283-5, 1995.

COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology** 140, 22–30, 2013.

CONNERS, E. E.; VINETZ, J. M.; WEEKS, J. R.; BROUWER, K. C. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta Trop.**, 156: 68-78, 2016.

COOKE, G.; ARMSTRONG, M. E.; DONNELLY, S. C. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. **Biofactors**, 35: 165-168, 2009.

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

CORTEZ, C.; SOBREIRA, T. J.; MAEDA, F. Y.; YOSHIDA, N. The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Subcell. Biochem.**, 74: 137-50, 2014.

COSSIO, P. M.; DAMILANO, G.; DE LA VEGA, M. G.; LAGUENS, M. T.; CABEZA MECKERT, P.; DIEZ, C.; ARANA, R. M. *In vitro* interaction between lymphocytes of Chagasic individuals and heart tissue. **Medicina**, 36 (4): 287-293, 1976.

CRONSTEIN, B. N.; MONTESINOS, M. C.; WEISSMANN, G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFkappaB. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 96 (11): 6377-81, 1999.

CRONSTEIN, B. N.; VAN DE STOUWE, M.; DRUSKA, L.; LEVIN, R. I.; WEISSMANN, G. Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil

adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. **Inflammation**, 18 (3): 323-35, 1994.

DA COSTA, T. A.; SILVA, M. V.; MENDES, M. T.; CARVALHO-COSTA, T. M.; BATISTA, L. R.; LAGES-SILVA, E.; RODRIGUES, V.; OLIVEIRA, C. J.; RAMIREZ, L. E. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. **J. Immunol. Res.**, ID 962047, 2014.

D'ANGELO, M. A.; MONTAGNA, A. E.; SANGUINETI, S.; TORRES, H. N.; FLAWIA, M. M. A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi*, which interacts with the structural flagellar protein paraflagellar rod. **J. Biol. Chem.**, 277, 35025-35034, 2002.

DE CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Structure and Function**, 14 (4): 383-392, 1989.

DE LANA, M.; MARQUES, E.; MACHADO, D. M. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. Amsterdam: Elsevier, p. 339-363, 2010.

DE OLIVEIRA, R. B.; TRONCON, L. E.; DANTAS, R. O.; MENGHELLI, U. G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 93: 884-9, 1998.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J. Cell Biol.**, ID 295394, 2010.

DEMANGEL, C.; BERTOLINO, P.; BRITTON, W. J. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. **Eur. J. Immunol.**, 32: 994-1002, 2002.

DEN HAAN, J. M. M.; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptative immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. **Immunol. Lett.**, 162: 103-112, 2014.

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

DIAS, J. C. P. Mecanismos de transmissão. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.4, p. 152-174, 1979.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 22 (3): 147-156, 1989.

DOCAMPO, R.; JIMENEZ, V.; KING-KELLER, S.; LI, Z. MORENO, S. N. J. The role of acidocalcisomes in the stress response of *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasitol.**, 75: 307-324, 2011.

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

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, 12: 1063-73, 1998.

DURAND, M.; SEGURA, E. The known unknowns of the human dendritic cell network. **Front. Immunol.**, 6 (129): 1-7, 2015.

DUTRA, W. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; CAÑADO, J. R.; PINTO-DIAS, J. C.; BRENER, Z.; FREEMAN, G. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELL, G.; PARRA, J. C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **Intern. Immunol.**, 6 (4): 499-506, 1994.

DUTRA, W. O.; MENEZES, , C. A. S.; MAGALHÃES, L. M. D.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol.**, 36, 377-387, 2015.

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

EIGLER, A.; SIEGMUND, B.; EMMERICH, U.; BAUMANN, K. H.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production, **J. Leukoc. Biol.**, 63: 101-107, 1998.

EMERY, A. C.; EIDEN, M. V.; EIDEN, L. E. A New site and mechanism of action for the widely used adenylate cyclase inhibitor SQ22,536. **Mol. Pharmacol.**, 83: 95–105, 2013.

ERDMANN, H.; STEEG, C.; KOCH-NOLTE, F.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cell Microbiol.**, 11 (11): 1600-11, 2009.

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

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

FERRANS, V. J.; MILEI, J.; TOMITA, Y.; STORINO, R. A. Basement membrane thickening in cardiac myocytes and capillaries in chronic Chagas' disease. **Am. J. Cardiol.**, 61 (13): 1137-40, 1988.

FERREIRA, I. de L.; SILVA, T. P. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infectans* in Brazil: an historical fact. **Rev.Soc. Bras. Med. Trop.**, 39: 507-509, 2006.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Doença de Chagas**. 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>> Acesso em: 19 nov. 2016.

FIORELLI, A. I.; SANTOS, R. H. B.; OLIVEIRA JR, J. L.; LOURENÇO-FILHO, D. D.; DIAS, R. R.; OLIVEIRA, A. S.; DA SILVA, M. F. A.; AYOUB, F. L.; BACAL, F. SOUZA, G. E. C.; BOCCHI, E. A.; STOLF, N. A. G. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. **Transplant. Proc.**, 43 (1): 220-224, 2011.

FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON, A.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; TELLEZ, I.; BARRAGÁN, M.; JONES, D.; NÁQUIRA, C. G.; MENDEZ, J. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. **BMC Int. Health Hum. Rights**, 7: 7, 2007.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, 294 (5548): 1871-1875, 2001.

FUJITA, S.; SEINO, K.; SATO, K.; SATO, Y.; EIZUMI, K.; YAMASHITA, N.; TANIGUCHI, M. Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. **Blood**, 107: 3656–3664, 2006.

GALGANI, M.; DE, R. V.; DE, S. S.; LEONARDI, A.; D'ORO, U.; NAPOLITANI, G.. MASCI, A. M.; ZAPPACOSTA, S.; RACIOPPI, L. Cyclic AMP modulates the functional plasticity of immature dendritic cells by inhibiting Src-like kinases through protein kinase A-mediated signaling. **J. Biol. Chem.**, 279: 32507–32514, 2004.

GALVÃO, C., org. Vetores da doença de Chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Série Zoologia: guias e manuais de identificação. Acesso: <http://books.scielo.org/id/mw58j>

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **J. Insect Physiol.**, 53 (1): 11-21, 2007.

GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. **Bioch. Biophys. Acta**, 1441: 278 – 287, 1999.

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

GARAY, J.; D'ANGELO, J. A.; PARK, Y.; SUMMA, C. M.; AIKEN, M. L.; MORALES, E.; BADIZADEGAN, K.; FIEBIGER, E.; DICKINSON, B. L. Crosstalk between PKA and Epac regulates the phenotypic maturation and function of human dendritic cells. **J. immunol.**, 185 (6): 3227-3238, 2010.

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

GEROSA, F.; BALDANI-GUERRA, B.; NISII, C.; MARCHESINI, V.; CARRA, G.; TRINCHIERI, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. **J. Exp. Med.**, 195 (3): 327-333, 2002.

GIL-JARAMILLO, N.; MOTTA, F. N.; FAVALI, C. B.; BASTOS, I. M.; SANTANA, J. M. Dendritic cells: A double-edged sword in immune responses during Chagas disease. **Front. Microbiol.**, 7:1076, 2016.

GOLDENBERG, S.; AVILA, A. R. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. **Adv. Parasitol.**, 75: 285-305, 2011.

GOODWIN, J. S.; BANKHURST, A. D.; MESSNER, R. P. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. **J. Exp. Med.** 146: 1719-34, 1977.

GORDON, J. R.; MA, Y.; CHURCHMAN, L.; GORDON, S. A.; DAWICKI, W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. **Front. Immunol.**, (5): 7, 1-19, 2014.

GRAVINA, H. D.; ANTONELLI, L.; GAZZINELLI, R. T. ROPERT, C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, 8(5): e63100, 2013.

GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMAN, S.; GEISSLINGER, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **J. Natl. Cancer Inst.**, 98 (11): 736-47, 2006.

GRÖSCH, S.; TEGEDER, I.; NIEDERBERGER, E.; BRÄUTIGAM, L.; GEISSLINGER, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. **FASEB J.**, 15 (14): 2742-4, 2001.

HACKSTEIN, H.; MORELLI, A. E.; LARREGINA, A. T.; GANSTER, R. W.; et al. Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. **J. Immunol.**, 166 (12): 7053-7062, 2001.

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

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

HALUSHKA, P. V.; MAIS D. V.; MAYEUX, R. P.; MORINELLI, T. A. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 29: 213-39, 1989.

HAMMAD, H.; KOOL, M.; SOULLIE, T.; NARUMIYA, S.; TROTTEIN, F.; HOOGSTEDEN, H. C.; LAMBRECHT, B. N. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, 204: 357–367, 2007.

HANIFFA, M.; GINHOUX, F.; WANG, X. N.; BIGLEY, V.; ABEL, M.; DIMMICK, I.; BULLOCK, S.; GRISOTTO, M.; BOOTH, T.; TAUB, P.; HILKENS, C.; MERAD, M.; COLLIN, M. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. **J. Exp. Med.** 206, 371–385, 2009.

HARIZI, H. CORCUFF, J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends Mol. Immunol.**, 14 (10): 461-469, 2008.

HARIZI, H.; GUALDE, N. Inhibition of IL-6, TNF- α and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E₂-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. **Cell Immunol.**, 228 (2): 99-109, 2004.

HARIZI, H.; JUZAN, M.; GROSSET, C.; RASHEDI, M.; GUALDE, N. Dendritic cells issued *in vitro* from bone marrow produce PGE₂ that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. **Cell. Immunol.**, 209: 19-28, 2001.

HIGUCHI, M. L.; FUKASAWA, S.; DE BRITO, T.; PARZIANELLO, L. C.; BELLOTTI, G.; RAMIRES, J. A. F. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. **Heart**, 82: 279–285, 1999.

HIGUCHI, M. L.; REIS, M. M.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56 (5): 485-489, 1997.

HIRAI, H.; TANAKA, K.; YOSHIE, O.; OGAWA, K.; KENMOTSU, K.; TAKAMORI, Y.; ICHIMASA, M.; SUGAMURA, K.; NAKAMURA, M.; TAKANO, S.; NAGATA, K. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J. Exp. Med.**, 193: 255-61, 2001.

HISSA, B.; DUARTE, J. G.; KELLES, L. F.; SANTOS, F. P.; DEL PUERTO, H. L.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; DE PAULA, A. M.; AGERO, U.; MESQUITA, O. N.; GUATIMOSIM, C.; CHIARI, E.; ANDRADE, L. O. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 6 (3): e1583, 2012.

HOLDSWORTH, S. R.; CAN, P. Y. Cytokines: names and numbers you should care about. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, 10: 2243-2254, 2015.

ISSA, V. S.; AMARAL, A. F.; CRUZ, F. D.; FERREIRA, S. M. A.; GUIMARÃES, G. V.; CHIZZOLA, P. R.; SOUZA, G. E. C.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A. β -blocker therapy and mortality of patients with Chagas cardiomyopathy: a subanalysis of the REMADHE prospective trial. **Circ. Heart Fail.**, 3: 82-8, 2010.

JING, H.; VASSILIOU, E.; GANEA, D. Prostaglandin E₂ inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, 74: 868-79, 2003.

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L., orgs. Doença de Chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. Acesso: <http://books.scielo.org>.

KABUTUTU, Z.; MARTIN, S. K.; NOZAKI, T.; KAWAZU, S.; OKADA, T.; MUNDAY, C. J.; DUSZENKO, M.; LAZARUS, M.; THUITA, L. W.; URADE, Y.; KUBATA, B. K. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H₂ reductase in *Leishmania*. **Int. J. Parasitol.**, 33 (2): 221-228, 2003.

KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; SNIJDERS, A.; SNIJDEWINT, F. G.; KAPSENBERG, M. L. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂, promote Th2 responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 417: 363-7, 1997.

KALINSKI, P.; HILKENS, C. M. U.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol. Today**, 20 (12): 561-567, 1999.

KAMBAYASHI, T.; WALLIN, R. P. A.; LJUNGGREN, H. G. cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. **J. Leuk. Biol.**, 70 (6): 903-910, 2001.

KATSUYAMA, M.; NISHIGAKI, N.; SUGIMOTO, Y.; MORIMOTO, K.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. The mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. **FEBS Lett.**, 372: 151-6, 1995.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, 12 (7): 511-517, 2010.

KIM, H. J.; LEE, Y. H.; IM, S. A.; KIM, K.; LEE, C. K. Cyclooxygenase inhibitors, aspirin and ibuprofen, inhibit MHC-restricted antigen presentation in dendritic cells. **Immune Network**, 10 (3): 92-98, 2010.

KLOS, A.; TENNER, A. J.; JOHSWICH, K. O.; AGER, R. R.; REIS, E. S.; KÖHL, J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. **Mol. Immunol.**, 46: 2753-2766, 2009.

KLOTZ, K. N.; KACHLER, S. Inhibitors of membranous adenylyl cyclases with affinity for adenosine receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 389: 349–352, 2016.

KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.**, 6: 63-116, 1968.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 177(10): 7059–7066, 2006.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, 265: 956-9, 1994.

KÚDELA, P.; SCHWARCZOVÁ, Z.; SEDLÁK, J.; BIZIK, J. Conditioned medium from HeLa cells enhances motility of human monocyte-derived dendritic cells but abrogates their maturation and endocytic activity. **Neoplasma** 48 (5): 382-8, 2001.

KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; MCDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C.; STALLINGS, W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, 384: 644-648, 1996.

LAM, B. K.; GAGNON, L.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN, R. J. The mechanism of leukotriene B₄ export from human polymorphonuclear leukocytes. **J. Biol. Chem.**, 265:13438-13441, 1990.

LANDI, A.; BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Dendritic cells matured by a prostaglandin E₂-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- α or LPS. **Immunobiology**, 216 (6): 649–662, 2011.

LAUCELLA, S. A.; ROTTENBERG, M. E.; TITTO, E. H. Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. **Rev. Argent. Microbiol.**, 28: 99-109, 1996.

LAXMAN, S.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide signaling mechanism in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. **Mol. Interv.**, 7: 203-215, 2007.

LEANDER, R.; FRIEDMAN, A. Modulation of the cAMP response by $G\alpha_i$ and $G\beta\gamma$: a computational study of G protein signaling in immune cells. **Bull. Math. Biol.**, 76 (6):1352-1375, 2014.

LECOMTE, M.; LANEUVILLE, O.; JI, C.; DEWITT, D. L.; SMITH, W. L. Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase- 2) by aspirin. **J. Biol. Chem.**, 269: 13207-15, 1994.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect. Dis.**, 13 (4): 342-348, 2013.

LEWIS, K. L.; REIZIS, B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, 4: a007401, 2012.

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

LIN, H. C.; DUNCAN, J. A.; KOZASA, T.; GILMAN, A. G. Sequestration of the G protein beta gamma subunit complex inhibits receptor-mediated endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 95 (9): 5057-60, 1998.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiol. Rev.** 82, 97-130, 2002.

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

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

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEE-LIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J. D. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Exp. Parasitol.**, 142 (2): 167-71, 2010.

LUFT, T.; JEFFORD, M.; LUETJENS, P.; TOY, T.; HOCHREIN, H.; MASTERMAN, K. A.; MALISZEWSKI, C.; SHORTMAN, K.; CEBON, J.; MARASKOVSKY, E. Functionally distinct dendritic cell populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific DC subsets. **Blood**, 100: 1362-72, 2002.

LYNCH, K. R.; O'NEILL, G. P.; LIU, Q.; IM, D. S.; SAWYER, N.; METTERS, K. M.; COULOMBE, N.; ABRAMOVITZ, M.; FIGUEROA, D. J.; ZENG, Z.; CONNOLLY, B. M.; BAI, C.; AUSTIN, C. P.; CHATEAUNEUF, A.; STOCCO, R.; GREIG, G. M.; KARGMAN, S.; HOOKS, S. B.; HOSFIELD, E.; WILLIAMS, JNR, D. L.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; CASKEY, C. T.; EVANS, J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. **Nature**, 299: 789-793, 1999.

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

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

MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; ROSSI, M. A.; ESPER, L.; TANOWITZ, H. B.; ALIBERTI, J.; SILVA, J. S. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect.**, 10 (14-15): 1558-66, 2008.

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

MAGALHÃES, L. M. D.; VIANA, D.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 9: e0003816, 2015.

MAGUIRE, J. H.; HOFF, R.; SHERLOCK, I.; GUIMARÃES, A. C.; SLEIGH, A. C.; RAMOS, N. B.; MOTT, K. E.; WELLER, T. H. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, 75: 1140-45, 1987.

MALKOWSKI, M. G.; GINELL, S.; SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. **Science**, 289: 1933-1937, 2000.

MALVEZI, A. D.; PANIS, C.; DA SILVA, R. V.; DE FREITAS, R. C.; LOVO-MARTINS, M. I.; TATAKIHARA, V. L.; ZANLUQUI, N. G.; NETO, E. C.; GOLDENBERG, S.; BORDIGNON, J.; YAMADA-OGATTA, S. F.; MARTINS-PINGE, M. C.; CECCHINI, R.; PINGE-FILHO, P. Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry into cardiac cells and promotes differential modulation of the inflammatory response. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 58 (10): 6157-64, 2014.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**, 115 (9): 1109-1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A.; DE ALMEIDA FILHO, O. C.; PAZIN-FILHO, A.; MACIEL, B. C. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. **Arq. Bras. Cardiol.**, 79 (6): 623-627, 2002.

MATASIC, R.; DIETZ, A. B.; S. VUK-PAVLOVIC, S. Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. **Immunology**, 101: 53-60, 2000.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: The global burden of disease framework. **PLOS Negl. Trop. Dis.** 1 (2): e114, 2007.

MCADAM, B. F.; CATELLA-LAWSON, F.; MARDINI, I. A.; KAPOOR, S.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96, 272-277, 1999.

MEDEIROS, A.; PERES-BUZALAF, C.; VERDAN, F. F.; SEREZANI, C. H. Prostaglandin E₂ and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. **Mediat. Inflamm.**, ID 327568, 2012.

MEDEIROS, M. M.; PEIXOTO, J. R.; OLIVEIRA, A. C.; CARDILO-REIS, L.; KOATZ, V. L. G.; VAN KAER, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; NOBREGA, A.; BELLIO, M. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Leukoc. Biol.**, 82 (3): 488-496, 2007.

MEIRELLES, M. N. L.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; MIRANDA, C. F.; DE SOUZA, W.; BARBOSA, H. S. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. **Z Parasitenkd** 68 (1): 7-14, 1982.

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

MINAKUCHI, R.; WACHOLTZ, M. C.; DAVIS, L. S.; LIPSKY, P. E. Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE₂. **J. Immunol.** 145: 2616-25, 1990.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico** vol 46 nº 21, 2015.

MONCAYO, A. C.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 104, suppl. 1: 17-30, 2009.

MONTEIRO, A. C.; SCHMITZ, V. MORROT, A.; DE ARRUDA, L. B.; NAGAJYOTHI, F.; GRANATO, A.; PESQUERO, J. B.; MÜLLER-ESTERL, W.; TANOWITZ, H. B.; SCHARFSTEIN, J. Bradykinin B2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective Type-1 responses. **PLoS Patholog.**, 3 (11): e185, 2007.

MONTEIRO, A. C.; SCHMITZ, V.; SVENSJO, E.; GAZZINELLI, R. T.; ALMEIDA, I. C.; TODOROV, A.; DE ARRUDA, L. B.; TORRECILHAS, A. C.; PESQUERO, J. B.; MORROT, A.; BOUSKELA, E.; BONOMO, A.; LIMA, A. P.; MÜLLER-ESTERL, W.; SCHARFSTEIN, J. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 177 (9): 6325-6335, 2006.

MORROW, J. D.; HILL, K. E.; BURK, R. F.; NAMMOUR, T. M.; BADR, K. F.; ROBERTS II, L. J. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87:9383-9387, 1990.

MUKHERJEE, S.; MACHADO, F. S.; HUANG, H.; OZ, H. S.; JELICKS, L. A.; PRADO, C. M.; KOBAYASHI, W.; FINE, E. J.; ZHAO, D.; FACTOR, S. M.; COLLADO, J. E.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; ASHTON, A. W. Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. **PLoS One**, 6 (2): e16959, 2011.

NARDY, A. F.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; PÉREZ, A. R.; MORROT, A. Role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. **Front. Microbiol.**, 7: 348, 2016.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors. structures, properties, and functions. **Physiol. Rev.**, 79: 1193-26, 1999.

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

NEEFJES, J.; JONGSMA, M. L.; PAUL, P.; BAKKE, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat. Rev. Immunol.**, 11: 823-836, 2011.

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

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infect. Immun.**, 66 (6): 2460-5, 1998.

NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **J. Am. Col. Cardiol.** 62 (9): 767-76, 2013.

O'NEILL, D. W.; ADAMS, S.; BHARDWAJ, N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. **Blood J.** 104, 2235–2246, 2004.

OLIVEIRA, J. S. M. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. **Am. Heart J.**, 110 (5): 1092-98, 1985.

OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, J.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **J. Immunol.**, 168 (12): 6366-6374, 2002.

OZEGBE, P.; FOEY, A. D.; AHMED, S.; WILLIAMS, R. O. Impact of cAMP on the T-cell response to type II collagen. **Immunology**, 111: 35-40, 2004.

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

PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z.; VICTORINO, V. J.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; CECCHINI, R.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp. Parasitol.**, 127 (1): 58-65, 2011.

PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R.; MARIANO, F. S.; PRADO, C. M.; FERREIRA, B. R.; TEIXEIRA, M. M.; CANETTI, C.; ROSSI, M. A.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. 5-Lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, 12 (8-9): 587-97, 2010.

PEARCE, E. J.; EVERTS, B. Dendritic cell metabolism. **Nat. Rev. Immunol.** 15, 18–29, 2015.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Today**, 12: 349-52, 1991.

PICCIOLI, D.; SBRANA, S.; MELANDRI, E.; VALIANTE, N. M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. **J. Exp. Med.**, 195 (3): 335-341, 2002.

PICCIOLI, D.; TAVARINI, S.; BORGOGNI, E.; STERI, V.; NUTI, S.; SAMMICHELI, C.; BARDELLI, M.; MONTAGNA, D.; LOCATELLI, F.; WACK, A. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. **Blood.**, 109: 5371-5379, 2007.

PIDOUX, G.; TASKÉN, K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. **J. Mol. Endocrinol.** 44: 271-284, 2010.

PIERRE, S.; ESCHENHAGEN, T.; GEISLINGER, G.; SCHOLICH, K. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 8 (4): 321–335, 2009.

PINAZO, M. J.; CAÑAS, E.; ELIZALDE, J. I.; GARCIA, M.; GASCÓN, J.; GIMENO, F.; GOMEZ, J.; GUHL, F.; ORTIZ, V.; POSADA EDE, J.; PUENTE, S.; REZENDE, J.; SALAS, J.; SARAVIA, J.; TORRICO, F.; TORRUS, D.; TREVIÑO, V. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterol. Hepatol.**, 33: 191-200, 2010.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol.**, 193 (1): 90-98, 1999.

PLANELLES, L.; THOMAS, M. C.; MARAÑÓN, C.; MORELL, M.; LÓPEZ, M. C. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. **Clin. Exp. Immunol.**, 131: 41-47, 2003.

POLOSO, N. J.; URQUHART, P.; NICOLAOU, A.; WANG, J.; WOODWARD, D. F. PGE2 differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4). **Mol. Immunol.** 54: 284-295, 2013.

PONCINI, C. V.; ALBA SOTO, C. D.; BATALLA, E.; SOLANA, M. E.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, 76 (6): 2633-2641, 2008.

PONCINI, C. V.; GIMÉNEZ, G.; PONTILLO, C. A.; ALBA SOTO, C. D.; DE ISOLA, E. I. D.; PIAZZÓN, I.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M. Central role of extracellular signal-regulated kinase and toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Immunol.**, 47 (11-12): 1981-1988, 2010.

PONCINI, C. V.; ILARREGUI, J. M.; BATALLA, E. I.; ENGELS, S.; CERLIANI, J. P.; CUCHER, M. A.; VAN KOOYK, Y.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M.; RABINOVICH, G. A.

Trypanosoma cruzi infection imparts a regulatory program in dendritic cells and T cells via galectin-1–dependent mechanisms. **J. Immunol.**, 195 (7): 3311-3324, 2015.

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

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

RASSI, A, JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet** 375:1388–402, 2010.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect. Dis. Clin. North Am.** 26: 275-91, 2012.

REGAN, J. W. EP₂ and EP₄ prostanoid receptor signaling. **Life Sciences**, 74: 143-153, 2003.

RIBEIRO, A. L.; LOMBARDI, F.; SOUSA, M. R.; ROCHA, M. O. Vagal dysfunction in Chagas disease. **Cardiology**, 103 (2): 225-6, 2005.

RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, M. O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat. Rev. Cardiol.** 9: 576-89, 2012.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31 (3): 301-314, 1998.

RIBEIRO, A. L.; SABINO, E. C.; MARCOLINO, M. S.; SALEMI, V. M. C.; IANNI, B. M.; FERNANDES, F.; NASTARI, L.; ANTUNES, A.; MENEZES, M.; OLIVEIRA, C. D. L.; SACHDEV, V.; CARRICK, D. M.; BUSCH, M. P.; MURPHY, E. L. Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive and seronegative former blood donors. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, 7 (2): e2078, 2013.

RIEKE, C. J.; MULICHAK, A. M.; GARAVITO, M.; SMITH, W. L. The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. **J. Biol. Chem.**, 274 (24): 17109-17114, 1999.

ROBBIANI D. F.; FINCH R. A.; JAGER D.; MULLER W. A.; SARTORELLI A. C.; RANDOLPH G. J. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. **Cell** 103: 757–68, 2000.

- RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. **J. Parasitol. Res.** 1-12, 2012.
- RODRÍGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M. G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **J. Cell Biol.**, 134, 349-362, 1996.
- RODRÍGUEZ, A.; RIOULT, M. G.; ORA, A.; ANDREWS, N. W. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J. Cell Biol.**, 129, 1263-1273, 1995.
- RODRIGUEZ, P.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Activation of cord blood myeloid dendritic cells by *Trypanosoma cruzi* and parasite-specific antibodies proliferation of CD8⁺ T cells, and production of IFN-gamma. **Med. Microbiol. Immunol.**, 201: 157-169, 2012a.
- RODRIGUEZ, P.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. *Trypanosoma cruzi* activates cord blood myeloid dendritic cells independently of cell infection. **Med. Microbiol. Immunol.**, 201: 287-296, 2012b.
- ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. **J. Biol. Chem.** 283: 8065–8069, 2008.
- RUBBO, H.; DENICOLA, A.; RADİ, R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. **Arch. Biochem. Biophys.**, 308: 96-102, 1994.
- RUBIN-DE-CELIS, S. S. C.; UEMURA, H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol.**, 8 (12): 1888-1898, 2006.
- RUIZ, R. C.; FAVORETO JUNIOR; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca⁺² signalling activity. **Biochem. J.**, 330: 505-511, 1998.
- RUIZ, R. C.; RIGONI, V. L.; GONZALEZ, J.; YOSHIDA, N. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. **Parasite Immunol.**, 15: 121-125, 1993.
- RUSSELL, S.W.; PACE, J. L. Both the kind and magnitude of stimulus are important in overcoming the negative regulation of macrophage activation by PGE₂. **J. Leukoc. Biol.** 35: 291-301, 1984.

SADANA, R.; DESSAUER, C. W. Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. **Neurosignals**, 17 (1): 5-22, 2009.

SANTOS, D. O.; OLIVEIRA, M. O. Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 83: 287-292, 1988.

SCALES, W. E.; CHENSUE, S. W.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S. L. Regulation of monokine gene expression: prostaglandin E2 suppresses tumor necrosis factor but not interleukin-1 α or beta-mRNA and cell associated bioactivity. **J. Leukoc. Biol.**, 45 (5): 426-21, 1989.

SCANDELLA, E., MEN, Y., GILLESSEN, S., FORSTER, R., GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood** 100, 1354–1361, 2002.

SCANDELLA, E.; MEN, Y.; LEGLER, D. F.; GILLESSEN, S.; PRIKLER, R.; LUDEWIG, B.; GROETTRUP, M. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. **Blood** 103: 1595–601, 2004.

SCHENKMAN, S.; DIAS, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptor at restricted cell surface domains. **Exp. Parasitol.**, 72 (1): 76-86, 1991.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M. S.; HART, G. W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, 65 (7): 1117-25, 1991.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R. A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **J. Cell Sci.**, 101 (4): 895-905, 1992.

SCHMID, C.; TJAN, T. D. T.; ETZ, C.; SCHMIDT, C.; WENZELBURGER, F.; WILHELM, M.; ROTHENBURGER, M.; DREES, G.; SCHELD, H. H. First clinical experience with the InCor left ventricular assist device. **J. Heart Lung Transplant.**, 24 (9): 1188-1194, 2005.

SCHMITZ, V.; ALMEIDA, L. N.; SVENSHÖ, E.; MONTEIRO, A. C.; KÖHL, J. SCHARSTEIN, J. C5a and bradykinin receptor cross-talk regulates innate and adaptive immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, 193 (7): 3613-3623, 2014.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop.**, 115 (1-2): 14-21, 2010.

SCHNEIDER, C.; BRASH, A. R. Stereospecificity of hydrogen abstraction in the conversion of arachidonic acid to 15R-HETE by aspirin treated cyclooxygenase-2.

Implications for the alignment of substrate in the active site. **J. Biol. Chem.**, 275: 4743-6, 2000.

SCHNURR, M.; TOY, T.; SHIN, A.; WAGNER, M.; CEBON, J.; MARASKOVSKY, E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. **Blood** 105 (4): 1582-1589, 2005.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. P. A cost-benefit analysis of Chagas disease control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 86 (3): 285-95, 1991.

SCHÖNTHAL, A. H. Direct non-cyclooxygenase-2 targets of celecoxib and their potential relevance for cancer therapy. **Brit. J. Cancer** 97: 1465 – 1468, 2007.

SCHWAB, J. M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cur. Op. Pharmacol.**, 6: 414-420, 2006.

SEGURA, E. Review of mouse and human dendritic cell subsets. **In:** SEGURA, E.; ONAI, N. eds. Dendritic cell protocols. New York: Springer Science + Business Media, p. 3-15, 2016.

SEGURA, E.; AMIGORENA, S. Cross-presentation in mouse and human dendritic cells. **Adv. Immunol.**, 127: 1-31, 2015.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91 (25): 12013-12017, 1994.

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

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat. Rev. Immunol.** 8(5): 349-361, 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.** 54: 845-52, 2012.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol. Rev.**, 240 (1): 72-91, 2011.

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

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

SNYDER, D. S.; BELLER, D. I.; UNANUE, E. R. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. **Nature** 299: 163-5, 1982.

SOLOMON, S. D.; MCMURRAY, J. J. V.; PFEFFER, M. A.; WITTES, J.; FOWLER, R.; FINN, P.; ANDERSON, W. F.; ZAUBER, A.; HAWK, E.; BERTAGNOLLI, M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. **N. Engl. J. Med.** 352, 1071-1080, 2005.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. **Nat. Med.** 13, 1155–1159, 2007.

SUNAHARA, R. K.; TAUSSIG, R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. **Mol. Interv.**, 2 (3): 168-84, 2002.

TAGOE, D. N.; KALEJAIYE, T. D.; DE KONING, H. P. The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! **Front. Pharmacol.**, 6: 185, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, 140: 805-820, 2010.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in T. cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infect. Immun.**, 12: 4247-4253, 2002.

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

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

TAUBERT, D.; BERKELS, R.; GROSSER, N.; SCHRÖDER, H.; GRÜNDEMANN, D.; SCHÖMIG, E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. **Br. J. Pharmacol.**, 143 (1): 159-65, 2004.

TERRAZAS, C. A.; HUITRON, E.; VAZQUEZ, A.; JUAREZ, I.; CAMACHO, G. M.; CALLEJA, E. A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK. **Int. J. Biol. Sci.**, 7 (9): 1298-1310, 2011.

TERRAZAS, C. A.; TERRAZAS, L. I.; GÓMEZ-GARCIA, L. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. **J. Biomed. Biotechnol.**, 2010: 357106, 2010.

THE LANCET EDITORIAL. Chagas' disease - an epidemic that can no longer be ignored. 368: 619, 2006.

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

THURESSON, E. D.; LAKKIDES, K. M.; RIEKE, C. J.; WINGERD, B. A.; MICIELLI, R.; MULICHAK, A. M.; MALKOWSKI, M. G.; GARAVITO, R. M.; SMITH, W. L. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. **J. Biol. Chem.**, 276: 10347-57, 2001.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **Int. J. Parasitol.**, 28: 85-104, 1998.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.**, 108 (1): 15-23, 2001.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, I. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J. Immunol.**, 153: 3141-3147, 1994.

TOSCO, P.; LAZZARATO, L. Mechanistic insights into cyclooxygenase irreversible inactivation by aspirin. **ChemMedChem**, 4: 939-945, 2009.

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

VAN DRIEL, B. J.; LIAO, G.; ENGEL, P.; TERHORST, C. Responses to microbial challenges by SLAMF receptors. **Front. Immunol.**, 7:4, 2016.

VAN HELDEN, S. F. G.; KROOSHOO, D. J. E. B.; BROERS, K. C. M.; RAYMAKERS, R. A. P.; FIGDOR, C. G.; van LEEUWEN F. N. A critical role for prostaglandin e2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. **J. Immunol.**, 177: 1567-1574, 2006.

VAN OVERTVELT, L.; ANDRIEU, M.; VERHASSELT, V.; CONNAN, F.; CHOPPIN, J.; VERCRUYSSSE, V.; GOLDMAN, M.; HOSMALIN, A.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8^+ T lymphocytes. **Int. Immunol.**, 14: 1135-1144, 2002.

VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect. Immun.**, 67: 4033-4040, 1999.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb. Res.**, 110 (5-6): 255-8, 2003.

VASSILIOU, E.; JING, H.; GANEA, D. Prostaglandin E₂ inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. **Cell Immunol.**, 223: 120-32, 2003.

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nat. Rev. Microbiol.**, 7 (6): 424-438, 2009.

VERHASSELT, V.; BUELENS, C.; WILLEMS, F.; DE GROOTE, D.; HAEFNER-CAVAILLON, N.; GLODMAN, M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J. Immunol.**, 158: 2919-2925, 1997.

VRAY, B.; CAMBY, I.; VERCRUYSSSE, V.; MIJATOVIC, T.; BOVIN, N. V.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. KALTNER, H.; SALMON, I.; GABIUS, H. J.; KISS, R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, 14 (7): 647-657, 2004.

VYAS, J. M.; VAN DER VEEN, A. G.; PLOEGH, H. L. The known unknowns of antigen processing and presentation. **Nat. Rev. Immunol.**, 8: 607-618, 2008.

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

WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B. S.; DREW, M. E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Mol. Life Sci.**, 71 (7): 1245-63, 2014.

WEHBI, V. L.; TASKÉN, K. Molecular mechanism for cAMP-mediated immunoregulation in T cells – Role of anchored protein kinase A signaling units. **Front. Immunol.**, 7: 222, 2016.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis). 2017.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs30/en/>>.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Effects of leukotriene C₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J. immunol.**, 134: 1989-1993, 1985.

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

YAN, S.; HUANG, Z.; ANDREWS, R. K.; TANG, W. Conversion of forskolininsensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, 53:182–187, 1998.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y.; SHIMIZU, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. **Nature**, 387 (6633): 620-624, 1997.

YOKOMIZO, T.; KATO, K.; TERAWAKI, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J. Exp. Med.**, 192 (3): 421–432, 2000.

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

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

ZELLE-RIESER, C.; RAMONER, R.; ARTNER-DWORZAK, E.; CASARI, A.; BARTSCH, G.; THURNHER, M. Human monocyte-derived dendritic cells are deficient in prostaglandin E₂ production. **FEBS Lett.**, 511(1-3):123-6, 2002.

ZENIAN, A.; KIERSZENBAUM, F. *Trypanosoma cruzi*: differences in cell surface interaction of circulating trypomastigotes and culture epimastigote forms with macrophages. **J. Parasitol.**, 69 (4): 660-5, 1983.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G., BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 104: 1051-1054, 2009.

ZÚÑIGA, E.; GRUPPI, A.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. I.; RABINOVICH, G. A. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbial activity and survival. **Infect. Immun.**, 69 (11): 6804-6812, 2001a.

ZÚÑIGA, E.; RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; GRUPPI, A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **J. Leukoc. Biol.**, 70 (1): 73-79, 2001b.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Projeto de Pesquisa 2012



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	020/2012
CAAE:	01229412.7.0000.5231
Processo:	5491/2012
Pesquisador(a):	Phílano Pinge Filho
Unidade/Órgão:	CCB – Departamento de Ciências Patológicas
<p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">"Imunopatologia da Doença de Chagas Experimental"</p>	
<p>Situação do Projeto: Aprovado</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.</p>	
<p align="center">Londrina, 19 de março de 2012.</p> <p align="center">  Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina </p>	

ANEXO B
Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – Projeto de Pesquisa 2012



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 122/12

Londrina, 10 de Maio de 2012

Prezado Pesquisador

A CEUA/UUEL, reunida em 8 de Maio de 2012, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Mecanismo de ativação e invasão de fagócitos pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*: relações entre eicosanóides, óxido nítrico e c-AMP**", registrado no CEUA sob o processo nº 5492.2012.22, desenvolvido sob sua responsabilidade. O projeto está *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 400 camundongos, sendo 200 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c (20 grupos de 10 animais por grupo) e 200 camundongos machos divididos em 150 camundongos da linhagem C57BL/6 (15 grupos de 10 animais por grupo), 50 camundongos deficientes para 5-lipoxigenase (5 grupos de 10 animais por grupo), com idade entre 8 a 12 semanas. Neste projeto serão investigados os efeitos combinados de inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da 5-lipoxigenase (5-LO), c-AMP e óxido nítrico (NO) sobre a produção de H₂O₂, O²⁻, NO, IL-1β, IL-10, TNF-α, IL-12 por macrófagos peritoneais obtidos de animais normais e infectados com *T. Cruzi* (CEPA-Y). Serão avaliados os efeitos combinados de inibição da produção de eicosanóides c-AMP e NO sobre a infecção de macrófagos peritoneais e células dendríticas humanas com o protozoário *T. Cruzi* (CEPA-Y) e testar a hipótese de que o c-AMP controla a função tripanocida exercida por fagócitos mononucleares humanos e murinos e está sujeito às ações de mediadores lipídicos e do óxido nítrico. Os experimentos estão previstos para serem desenvolvidos em 36 meses após sua aprovação no CEUA-UUEL.

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

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Waldiceu Ap. Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior
Coordenador da CEUA/UUEL

**Ilma. Sr.
Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciência Patológicas
Centro de Ciências Biológicas**

Com cópia para Sr^a Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG) e Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL).

ANEXO C

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – Projeto de Pesquisa 2015



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 153/2015

Londrina, 30 de Julho de 2015.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UDEL reunida em 07 de Julho de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Efeito do bloqueio farmacológico de COX na infecção oral por *Trypanosoma cruzi***”, registrado sob o processo CEUA nº8504.2015.71, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 174 camundongos BALB/c, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando aproximadamente 20g e provenientes do Biotério do Instituto Carlos Chagas – ICC/FIOCRUZ. O projeto tem como objetivo analisar comparativamente o efeito do tratamento de camundongos com aspirina sobre a eficiência de infecção por via oral de formas metacíclicas de duas cepas de *T. cruzi*: CL14 e G. Para tanto, os animais serão divididos em grupos controles (não infectados e não tratados com aspirina) e experimentais (infectados e tratados ou não com aspirina e/ou omeprazol). Será administrada aspirina (100mg/kg) durante quatro dias após um período de restrição alimentar de 16 horas e alguns dos grupos experimentais receberão omeprazol via intraperitoneal (20mg/kg) diluído em água uma hora antes do tratamento com aspirina. Os camundongos serão infectados via oral com 4×10^5 cepas para determinação da carga parasitária no sangue e com 5×10^7 para análises histológicas do estômago. No quarto dia após a infecção o estômago de cada animal será processado para análise histopatológica (determinação do número de ninhos de amastigotas) e, no quinto dia após a infecção, a carga parasitária no sangue será determinada a cada dois dias. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

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

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

Waldiceu Aparecido Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UDEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho

Coordenador do Projeto

Departamento de Patologia Experimental

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Chefe do Departamento de Patologia Experimental e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

ANEXO D
Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – Manutenção do *Trypanosoma cruzi* 2014



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 183/2014

Londrina, 13 de Novembro de 2014.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 04 de Novembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Manutenção do *Trypanosoma cruzi* (Cepas Y, G e CL), agente causador da Doença de Chagas**”, registrado sob o processo CEUA nº26369.2014.66, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos, postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, estão respeitados.

Serão utilizados 360 camundongos Swiss fêmeas, com 7 semanas de idade e peso aproximado de 20 g provenientes do Biotério Central da UEL. Os animais serão utilizados para manutenção das cepas Y, G e CL do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas. Para tanto, os animais serão infectados com 200.000 formas tripomastigotas sanguíneas. Entre os dias 8 e 11 de infecção, os animais sob efeito de anestesia, serão submetidos à sangria por punção cardíaca para a obtenção de formas tripomastigotas. Os parasitos obtidos serão utilizados em ensaios *in vivo* para caracterizar a fase aguda e crônica da doença de chagas no modelo murino. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 24 meses, válidos para 2015 e 2016.

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



Waldiceu Ap. Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL) e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

ANEXO E
Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - Manutenção do *Trypanosoma cruzi* 2017



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 19/2017

Londrina, 17 de Fevereiro de 2017.

Prezado Pesquisador,


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

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

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

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

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


 Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Phileno Pingue Filho
 Coordenador do Projeto
 Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas
 Com cópia para Coordenação do Biotério Central / UEL; Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas