



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

VERA LÚCIA HIDEKO TATAKIHARA

**DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA
DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

Londrina
2017

VERA LÚCIA HIDEKO TATAKIHARA

**DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA
DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Phileo Pinge Filho.

Londrina
2017

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T216d Tatakihara, Vera Lúcia Hideko.

Doadores de óxido nítrico na patogênese da doença de chagas experimental /
Vera Lúcia Hideko Tatakihara. – Londrina, 2014.

90 f. : il.

Orientador: Phileo Pingue Filho.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Chagas, Doença de. – Teses. 2. Trypanosoma cruzi – Teses. 3. Óxido
nítrico – Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses. 5. Agentes antiinflamatórios –
Teses. I. Pingue Filho, Phileo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental.
III. Título.

CDU 616-092

VERA LÚCIA HIDEKO TATAKIHARA

**DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA
DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de novembro de 2014.

A Deus, ao meu esposo e filhos, aos
meus amigos, companheiros de
todas as horas...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, pela infinita paciência e dedicação demonstrada durante as etapas deste trabalho, pela amizade e carinho.

A minha família, pela confiança e motivação.

A minha amiga Aparecida Donizette Malvezi, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos Carolina Panis, Rosiane Valeriano da Silva, Nágela Ghabdan Zanluqui, Isabel Lovo Buch Pereira, Rafael Freitas pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao laboratório NIP V, em especial a Profa. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta e a Profa Dr^a Lucy Megumi Y. Lioni.

Aos amigos, pela força e pelo apoio recebido em relação a esta jornada.

Aos professores do Curso, pelos conhecimentos recebidos. Meu carinho especial ao Prof. Dr. Rubens Cecchini.

Aos colegas de Curso, pela troca de conhecimentos e apoio mútuo.

Aos técnicos de laboratório Zui e Pedrinho, Maria Lúcia Camilo de Almeida pela disponibilidade e amizade.

Aos meus amigos Valter Murad e Luis Custódio, pelo grande apoio e colaboração.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Aos que não impediram a finalização deste estudo.

TATAKIHARA, V. L. H. **Doadores de óxido nítrico na patogênese da doença de Chagas experimental.** 2014. 90 f. Tese de doutorado (Pós graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* produz uma intensa resposta inflamatória em diversos tecidos, inclusive no coração. A reação inflamatória é crítica para o controle da proliferação dos parasitos e evolução da Doença de Chagas (DC). Antiinflamatórios não esteróides liberadores de NO (AINES-NO) compõem uma nova classe de fármacos disponível para o tratamento de doenças inflamatórias. Pesquisas realizadas em nosso laboratório mostraram que antiinflamatórios não esteroides (AINES) convencionais como indometacina, aspirina e celecoxibe promovem aumento da carga parasitária no sangue e no tecido cardíaco de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *T. cruzi*. A capacidade do óxido nítrico (NO) em mediar a atividade anti-*T. cruzi* e o estresse oxidativo em eritrócitos durante a fase aguda da infecção, nos levou a investigar qual o impacto da administração de doadores de NO sobre a anemia, carga parasitária e estresse oxidativo em eritrócitos no início da infecção por *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados por *T. cruzi* (Cepa Y, 5 x 10³ formas tripomastigotas sanguíneas) via intraperitoneal. Após 30 minutos de infecção e nos subsequentes 12 dias, os animais foram tratados com indometacina-NO (indo-NO, 50 ppm/animal) ou sal de Angeli 15 minutos após infecção e diariamente por 12 dias (6 µg, 60 µg ou 600 µg) ip. O grupo controle recebeu 100 µL de PBS pela mesma via. O tratamento com indo-NO mostrou diminuição da sobrevivência, aumento da anemia e do estresse oxidativo, diminuição da produção de NO 'in vivo' e 'in vitro', além do aumento de internalização e saída de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em macrófagos. O tratamento com sal de Angeli na concentração de 60µg/Kg diminuiu a parasitemia, o número de ninhos no tecido cardíaco, a produção de NO plasmático, e o estresse oxidativo. Por outro lado, melhorou a leucopenia e a trombocitopenia. O tratamento 'in vitro' na concentração de 60 µM foi capaz de reduzir a produção de NO em cultura de macrófagos, diminuir a internalização e saída de formas tripomastigotas de macrófagos e diminuir a produção de IL-10.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. indometacina-NO. HNO. Doença de Chagas. Invasão celular. Óxido nítrico. Estresse oxidativo.

TATAKIHARA, V. L. H. **Nitric oxide donors in the pathogenesis of experimental Chagas' disease.** 2014. 90 p. Doctoral thesis (post-graduation in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi produces an intense inflammatory response in several tissues, including the heart. The inflammatory response is critical for controlling parasites proliferation and evolution of Chagas disease (CD). Non-steroidal anti-inflammatory releasing NO (NO-NSAIDs) constitute a new class of drugs available for the treatment of inflammatory diseases. Research conducted in our laboratory have shown that anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as conventional indomethacin, aspirin and celecoxib do not promote increased parasite burden in blood and heart tissue of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *T. cruzi*. The ability of nitric oxide (NO) in mediating the activity of anti-*T. cruzi* and oxidative stress in erythrocytes during the acute phase of infection, led us to investigate the impact of administration of NO donors on anemia, parasite burden and oxidative stress in erythrocytes at the beginning of infection by *T. cruzi*. C57BL/6 mice were infected with *T. cruzi* (Y strain, 5×10^3 trypomastigotes) intraperitoneally. After 30 minutes of infection and the subsequent 12 days, the animals were treated with indomethacin-NO (Indo-NO, 50 ppm/animal) or Angeli's salt 15 minutes after infection and daily for 12 days (6 μ g, 60 μ g, or 600 μ g/animal) ip. The control group received 100 μ L of PBS by the same route. Treatment with Indo-NO showed decreased survival, increased anemia and oxidative stress, decreased NO production *in vivo* and *in vitro*; apart from increased internalization and output trypomastigotes of *T. cruzi* in macrophages. The results obtained with treatment with Angeli's salt at a concentration of 60 μ g/kg decreased parasitemia and the number of nests in the cardiac tissue, decreased production of plasma NO, decreased oxidative stress and improved leukopenia and thrombocytopenia observed in acute infection. The *in vitro* at a concentration of 60 μ M treatment was able to reduce NO production in macrophage culture, internalization, release of trypomastigotes and decrease the production of IL-10.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. NO-indomethacin. HNO. Chagas Disease. Cell invasion. Nitric oxide. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fórmula estrutural do composto N-acetyl-D-cysteine-1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid, 4-(nitrooxy)butyl Ester.(NO indometacina)22
- Figura 2** – Fórmula estrutural dos compostos disodium diazen-1-ium- 1,2,2-triolate (sal de Angeli's) e sal de sódio de diazeniumdiolato isopropilamino (IPA/NO)23
- Figura 3** – Mecanismos endógenos propostos para a produção de HNO no endotélio vascular24
- Figura 4** – Protocolo experimental31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
ASA	Ácido acetil salicílico
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase do tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GPI	Glico-fosfatidil inositol
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GSR	Glutaciona redutase
HNO	Nitroxil
IFN	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IL-1	Interleucina do tipo 1
MDA	Malondialdeído
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NK	“Natural Killer”
NO	“Nitric Oxide” - Óxido Nítrico
NOS	“Nitric Oxide” Synthase - Óxido Nítrico Sintase
NSAIDs	“Non-steroidal anti-inflammatory drugs” - Drogas anti-inflamatórias não-esteróides
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PG	“Prostaglandins” - Prostaglandina
PGE ₁	Prostaglandina da classe E ₁
PGE ₂	Prostaglandina da classe E ₂
QL	Quimioluminescência

RNS	“Reactive nitrogen species” – Espécies reativas de nitrogênio
ROI	“Reactive intermediates from oxygen” - Intermediários reativos de oxigênio
ROS	“Reactive oxygen species” - Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
TLR	“Toll like receptor” - Receptor de toll-like
TNF	“Tumor necrosis factor” - Fator de Necrose Tumoral
TS	Trans-sialidase
T ^{ind}	Tempo de indução
TxA ₂	Tromboxano A ₂
URL	Unidade Relativa de Luz

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	<i>Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas</i>	13
1.2	<i>Doença de Chagas experimental</i>	15
1.3	<i>Infecção por Trypanosoma cruzi e AINES</i>	17
1.4	<i>Infecção por Trypanosoma cruzi e o papel do NO</i>	20
1.5	<i>AINES-NO</i>	21
1.6	<i>Sal de Angeli</i>	22
1.7	<i>Alterações hematológicas na doença de Chagas</i>	25
1.8	<i>Estresse oxidativo</i>	26
2.	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivos gerais.....	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Ética	30
3.2	Animais e reagentes.....	30
3.3	Parasitas e infecção	31
3.4	Parasitemia e taxa de sobrevivência	31
3.5	Coleta de sangue e obtenção de plasma	32
3.6	Quantificação de NO	32
3.7	Análise hematológica dos animais normais e infectados	33
3.7.1	Contagem do número de plaquetas	33
3.7.2	Determinação do hematócrito (Ht).....	34
3.7.3	Dosagem de Hemoglobina (Hb): método da cianometahemoglobina	34
3.7.3.1	Cálculo para fator de calibração	35
3.7.3.2	Cálculo para determinação da concentração de hemoglobina	35
3.7.4	Análise hematológica para determinação do número de leucócitos.....	35
3.7.4.1	Contagem de leucócitos	35
3.7.5	Contagem do número de reticulócitos	36
3.8	Avaliação do estresse oxidativo	36

3.8.1	Determinação do consumo de oxigênio e tempo de indução (T_{ind}) em eritrócitos.....	36
3.8.2	Quimiluminescência induzida por t-BHP	37
3.9	Análise histopatológica.....	37
3.10	Internalização de <i>T. cruzi</i> por macrófagos.....	37
3.10.1	Obtenção de macrófagos peritoneais.....	37
3.10.2	Obtenção de parasitos	38
3.10.3	Tratamento dos macrófagos.....	39
4.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	39
5.	<i>MANUSCRITO 1</i>	40
6.	<i>MANUSCRITO 2</i>	49
	Referências	82

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas.

As doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente populações de baixa renda que vivem em climas tropicais e subtropicais. Vários são os agentes etiológicos dessas doenças, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. A Doença de Chagas (DC) é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2012).

A DC, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina. A DC ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose amplamente distribuída nas Américas e tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (RASSI et al., 2012). Estima-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, sendo que a maioria na América Latina onde a DC é endêmica, e que mais de 25 milhões vivam sob o risco de contrair a doença. Contudo, na última década a incidência da doença aumentou nos países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, países da Europa e do Pacífico Ocidental. Isso se deve principalmente pela mobilidade entre a população da América Latina e o resto do mundo e, embora menos frequente, deve-se também por infecções através de transfusão sanguínea, transmissão vertical e doação de órgãos. Dados estatísticos indicam que somente no ano de 2008 a DC matou mais de 10 mil pessoas, sendo nesse mesmo ano a soro prevalência da DC em crianças entre 0 e 5 anos da ordem de 1/100.000 (MASSAD, 2008; CDC, 2013; WHO, 2013).

Trypanosoma cruzi, possui um ciclo de vida complexo, passando por estágios de desenvolvimento no inseto vetor (por exemplo *Triatoma infestans*) e no mamífero hospedeiro (RASSI et al., 2010). Em seu ciclo, *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984). Na forma tripomastigota (estágio infectante do parasito) o cinetoplasto situa-se posterior ao núcleo, em posição terminal ou subterminal, e o flagelo emerge da chamada bolsa

flagelar, de localização próxima ao cinetoplasto; nos epimastigotas (formas de multiplicação no inseto e em culturas axênicas) o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo; por fim, os amastigotas (estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras de mamíferos) são formas arredondadas que apresentam um flagelo curto, de difícil visualização (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984, BURLEIGH; ANDREWS, 1995; TYLER; ENGMAN, 2001).

A infecção caracteriza-se por uma fase aguda, com parasitemia intensa e sintomas como febre, fadiga e inchaço glandular. Nessa fase o parasita se dissemina pelo organismo, invade tecidos e órgãos e se multiplica. Em seguida a parasitemia é parcialmente controlada, sem eliminação completa do parasita e o paciente evolui para a fase crônica, onde a maioria dos pacientes é assintomática e apresenta baixa parasitemia (forma crônica indeterminada) (PINTO DIAS, 2000; WEN; GARG, 2004). Em poucos pacientes (cerca de 5%) a morte súbita pode ocorrer na fase aguda devida à falência cardíaca congestiva associada com miocardite ou meningoencefalite (ZACKS et al., 2005).

Cerca de 30 a 40% dos indivíduos infectados desenvolvem após 15 a 30 anos depois do início da infecção, doença inflamatória crônica (forma crônica determinada) com dilatação cardíaca. Essa miocardiopatia congestiva progressiva é a principal causa de morte súbita em indivíduos de meia idade nos países onde a infecção é endêmica, representando aproximadamente 50.000 mortes a cada ano (WEN et al., 2004). A lesão inflamatória do coração é caracterizada por um infiltrado de células mononucleares com destruição das fibras cardíacas no foco inflamatório, levando a áreas de fibrose e fenômenos tromboembólicos (ANDRADE; ANDRADE, 1979). A inflamação crônica leva a cardiomegalia com hipertrofia e dilatação das câmaras e aneurisma, particularmente na porção apical do ventrículo esquerdo que pode romper-se (ZACKS et al., 2005). O comprometimento do sistema nervoso entérico, principalmente no plexo de Auerbach (KÖEBERLE, 1968) conduz a lesões no trato digestório em cerca de 8 a 10 % dos pacientes infectados, manifestando-se inicialmente com dilatação do esôfago (megaesôfago) seguida por dilatação do cólon (megacólon) (DIAS, 1995).

A resposta imunológica pode contribuir para a patogenia da doença através de dois mecanismos: um processo auto-imune de destruição do tecido cardíaco do hospedeiro ou através de mediadores da resposta imunológica contra o parasita ou seus antígenos presentes no tecido (KIERSZENBAUM, 1985; GIRONÈS; FRESNO, 2003; TARLETON, 2003).

O tratamento medicamentoso para a doença de Chagas é capaz de curar de 70 a 100 % dos pacientes na fase aguda, com os medicamentos nifurtimox ou benzonidazol, porém na fase crônica o sucesso no tratamento é observado em um número limitado de casos (ANDRADE et al., 1992 e VIOTTI et al., 1994) não passando de 36,5% (CANÇADO, 1997). Além da ineficiência dos medicamentos na fase crônica existe ainda o seu efeito tóxico, salientando que ainda há muitas dificuldades a vencer, como o desenvolvimento de vacinas contra *T.cruzi* utilizáveis para humanos.

1.2 Doença de Chagas experimental

A DC, além de ser um sério problema de saúde pública, também atrai os imunologistas por servir como um modelo experimental para o estudo das alterações imunopatológicas desenvolvidas durante o curso da infecção por um microrganismo (DOS REIS, 2000).

A infecção por *T. cruzi* tem sido estudada em modelos animais desde a descoberta da doença. Animais como cães, cobaias e macacos (*Callithrix penicillata*) já foram inoculados experimentalmente (CABEZA-MECKERT; LAGUENS, 1994).

Pela facilidade de obtenção e manutenção, o camundongo (*Mus domesticus domesticus*) tem sido utilizado por muitos pesquisadores que buscam uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e de proteção que envolvem a doença de Chagas.

No modelo murino da doença de Chagas, a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção é dependente tanto da imunidade inata quanto da adquirida e está diretamente ligada ao padrão de produção de citocinas, o qual é crítico para a ativação de macrófagos e controle do parasitismo durante as

primeiras semanas após a infecção com *T. cruzi* (DOS REIS, 1997, ABRAHAMSOHN, 1998).

Evidências da participação dos macrófagos no controle da infecção por *T. cruzi* foram mostradas nos experimentos de Hoff (1975), Nogueira e Cohn (1978) que observaram que macrófagos de animais imunizados com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) apresentaram atividade tripanocida aumentada quando comparada com os macrófagos de animais não imunizados. A ativação dos macrófagos pelo BCG está associada a um aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) como, por exemplo, H_2O_2 (NATHAN, 1979). Porém o tratamento dos macrófagos com enzimas antioxidantes (SOD, CAT) ou benzoato de sódio, removedores de radicais livres produzidos pela explosão respiratória não inibiu a sua atividade tripanocida (MCCABE; MULLINS, 1990). Mais tarde foi mostrado que a atividade tripanocida dos macrófagos é dependente principalmente da produção de óxido nítrico (NO) (GAZZINELLI et al., 1992; VESPA et al., 1994).

Nesse contexto a interleucina 12 (IL-12) é considerada essencial para o estabelecimento de uma imunidade protetora mediada por células, durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1998). Esta citocina é capaz de estimular as células NK (“natural killer”) e células T a secretarem $IFN-\gamma$, que exerce papel fundamental na ativação dos macrófagos para a produção de $TNF-\alpha$ (MUÑOZ-FERNANDES et al., 1992). Por sua vez, $TNF-\alpha$ em conjunto com o $IFN-\gamma$ estimula o macrófago a produzir óxido nítrico (NO), o principal mediador que controla a replicação intracelular do parasito (GAZZINELLI et al., 1992; VESPA et al., 1994, SILVA et al., 1995). Ainda foi mostrado que IFN do tipo I co-estimula a síntese de NO na fase aguda da infecção, contribuindo para o controle da parasitemia em camundongos resistentes (COSTA et al., 1998).

A presença de $IFN-\gamma$ e quimiocinas (RANTES, MIP-2, entre outras) no coração dos camundongos infectados, em associação com IL-1 e $TNF-\alpha$, podem favorecer a expressão da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (MACHADO et al., 2000). A adição de inibidores seletivos da iNOS diminuiu de maneira significativa a produção de NO por cardiomiócitos e morte do parasita, mostrando de

maneira convincente que o NO exerce atividade tripanocida no tecido cardíaco de camundongos infectados por *T. cruzi* (MACHADO et al., 2000).

1.3 Infecção por *Trypanosoma cruzi* e AINES

A habilidade de *T. cruzi* para resistir aos radicais livres está relacionada com a presença de mecanismos como a tripanotiona e enzimas relacionadas que estão envolvidas na proteção contra dano causado por oxidantes, metais pesados e, possivelmente, xenobióticos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Embora a atividade no controle da multiplicação do parasito seja dependente de NO, os ROIs têm papel importante nas lesões teciduais ocorridas durante a infecção.

Por outro lado a interleucina-10 (IL-10) e o fator transformador do crescimento- β (TGF- β) possuem atividade reguladora negativa sobre os mecanismos tripanocidas (SILVA et al., 1992). Possivelmente esse efeito inibitório da IL-10 sobre a produção de IFN- γ e conseqüentemente sobre a produção de TNF- α consista em um mecanismo endógeno de prevenção de choque endotoxêmico promovido por altas concentrações de TNF- α (ABRAHAMSOHN, 1998).

A produção de outros mediadores inflamatórios, como por exemplo, IL-1 (TALERTON, 1988), IL-6 (TRUYEN et al., 1994) e metabólitos decorrentes da via da ciclooxigenase (COX) estão também aumentados durante a infecção por *T. cruzi* (CARDONI; ANTÚNEZ, 2004).

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

A inibição destas enzimas com substâncias anti-inflamatórias não esteróides convencionais (AINES) na redução da febre é causada pela inibição da formação de prostaglandina E_2 (PGE $_2$) via COX-1 (FERREIRA et al., 1971). Esta prostaglandina é um mediador importante para a ativação do centro nervoso (no hipotálamo), regulador da temperatura corporal e altos níveis de PGE $_2$ em estados inflamatórios (como infecções) elevam a temperatura (RODRIGUES, 1992).

A produção de prostaglandinas (PGs) dependente de COX-1 condiciona um grande número de funções fisiológicas, como a geração de TxA_2 pelas plaquetas, proteção celular da mucosa gástrica e síntese de PGs localizada, como aquela que ocorre no néfron e que afeta diferentes aspectos da função renal. Ao contrário, COX-2 é dificilmente detectada em células mantidas em repouso, mas é induzida em macrófagos, fibroblastos, endotélio vascular e células do músculo liso através de citocinas, endotoxinas, fatores de crescimento e promotores de tumores (SMITH; LANGENBACH, 2001).

O papel das PGs como mediadores das respostas imunológicas foi proposto pela primeira vez há mais de 25 anos (PHIPPS et al., 1991). Desde então, o envolvimento específico de diferentes PGs e COXs na patologia e fisiologia da resposta imunológica tornou-se cada vez mais detalhada (HARRIS et al., 2002).

AINES convencionais são amplamente utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. A marcante superioridade dos agentes anti-inflamatórios esteroidianos em relação àqueles não esteroidianos, no tratamento de doenças inflamatórias não infecciosas, encontra explicação justamente na capacidade que têm os primeiros de, agindo sobre as fosfolipases, inibirem ao mesmo tempo a biossíntese das PGs e dos leucotrienos (LTs), enquanto os segundos somente impedem a produção das PGs (RODRIGUES, 1992).

Alguns autores denominam alguns AINES como "específicos" para COX-2, mas na realidade eles podem também interagir com a COX-1, ainda que seja com baixa afinidade. Portanto a denominação mais coerente é a que tem sido adotada atualmente: "seletivos" pois não são específicos, mas tem maior afinidade por interagir, por se "encaixar" nos sítios de ligação da COX-2. A maior vantagem do uso dos AINES seletivos é a baixa possibilidade de irritação de mucosa gástrica, uma vez que não inibe substancialmente a COX-1 que originará a PGE_2 , responsável pela mucoproteção gástrica, como ocorre com os liberadores não seletivos (FERREIRA et al., 1971).

Alguns inibidores da COX-2 foram recentemente retirados do mercado devido a receios que fossem pró-trombóticos e aumentassem a probabilidade de um enfarte do miocárdio ou AVC. Em adição, a descoberta da COX-3 (BOTTING; AYOUB, 2005) e da COX-4 (SIMMONS; BOTTING, 2004), e as possíveis diferenciações entre

COX-1a e COX-1b, entre COX-2a, COX-2b e COX-2c, e ainda COX-3 com seus subtipos alfa e beta, não há como citar os reais efeitos de tais fármacos, já que tais enzimas foram negligenciadas nas pesquisas, o que quer dizer que nenhum dos fármacos é seguro totalmente.

Em estudos prévios, nossa equipe avaliou efeitos de diferentes AINES sobre o curso da infecção experimental com *T. cruzi* (Cepa Y)(PINGE-FILHO et al., 1999, TATAKIHARA et al., 2008). Utilizando camundongos BALB/c e C57BL/6 (modelos de susceptibilidade e resistência à infecção para a Cepa Y, respectivamente), mostramos que o bloqueio farmacológico da produção de PGs com os inibidores não seletivos para COX-1/COX-2 e seletivos para COX-2, provocaram o aumento da carga parasitária no sangue dos camundongos C57BL/6 e mortalidade de 100% no décimo segundo dia de infecção. Em relação aos camundongos BALB/c, o tratamento com celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2) aumentou a parasitemia no sangue enquanto que o tratamento com indometacina ou aspirina (inibidores não seletivos para COX) provocou uma tendência de redução nos níveis de parasitemia, mas não foi capaz de aumentar a sobrevivência dos mesmos.

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

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

C57BL/6, mas não alterou o curso da infecção em camundongos BALB/c tratados (TATAKIHARA et al., 2008).

O tratamento da DC ainda é insatisfatório. O benzonidazol, fármaco usado no tratamento desta enfermidade, mostra toxicidade significativa devendo ser administrado sob supervisão médica, devido aos seus inúmeros efeitos colaterais (COURA; CASTRO, 2002). Além disso, várias cepas do protozoário *T. cruzi* não respondem bem aos medicamentos atualmente disponíveis, necessitando assim, de um novo agente tripanocida eficaz (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2002). Neste contexto, a terapia contra *T. cruzi* baseado em compostos doadores de óxido nítrico (NO) forneceria uma alternativa interessante e importante para os fármacos tripanocidas existentes (NAPOLI; IGNARRO, 2003).

1.4 Infecção por *Trypanosoma cruzi* e o papel do NO

Concentrações fisiopatológicas de NO produzido durante a fase inicial da infecção aguda podem participar da morte dos parasitos nos macrófagos através de mecanismos NO-dependentes (VESPA et al., 1994). S-nitroso-acetyl-penicillamine (SNA) e sodium nitroprusside (SNP), doadores clássicos de NO, são conhecidos por lisar parasitos, provavelmente pela inativação da cisteína protease do parasito devido a geração de NO (BOCEDI et al., 2004). A modulação farmacológica da resposta imune contra *T. cruzi* através do controle dos níveis de NO tem sido aceito como alvo terapêutico (MAYA et al., 2007). A utilização de indutores da iNOS, de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, aumentaram de maneira significativa, a produção de NO por cardiomiócitos e o controle do crescimento parasitário, mostrando de maneira convincente que o NO exerce atividade tripanocida no tecido cardíaco de camundongos infectados por *T. cruzi* (MACHADO et al., 2000). Assim também, o composto rutênio doador de NO em doses específicas conseguiu eliminar ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de camundongos Swiss, além de assegurar a sobrevivência de todos os animais infectados (SILVA et al., 2009). Em 2010, Silva e colaboradores relataram que

novos complexos de NO-Rutênio eram hábeis em provocar a lise das formas tripomastigotas de *T. cruzi* presentes na corrente sanguínea.

1.5 AINES-NO

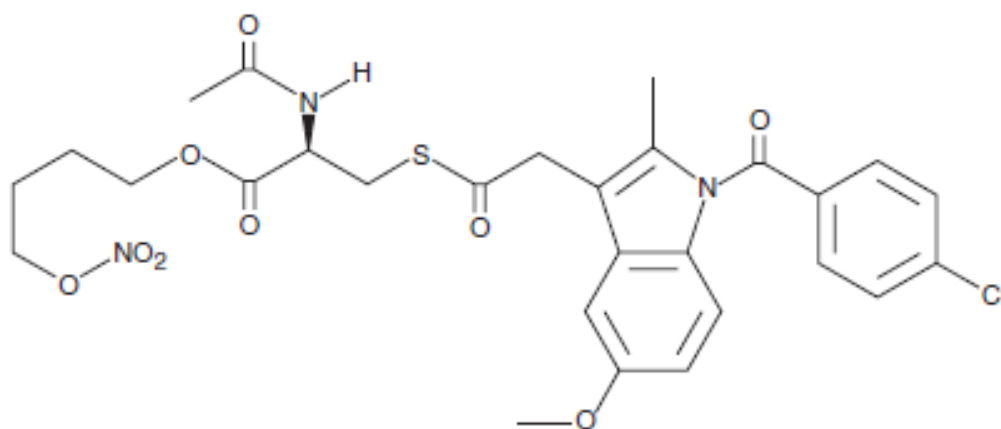
AINEs liberadores de NO (AINEs-NO) compõem uma nova classe de substâncias anti-inflamatórias e analgésicas, geradas pela adição de um nitroxibutil ou nitrosotiol em AINEs convencionais através de uma ligação éster (CARINI et al., 2004). A combinação da inibição balanceada de isoformas de COX com a disponibilização de NO confere aos AINEs-NO a habilidade de reduzir os efeitos indesejados dos AINEs convencionais, como por exemplo, dor gastrointestinal e toxicidade cardiorenal (WALLACE et al., 1997).

Nitroaspirina (NO-ASA ou NCX 4016) é o representante principal dos AINEs-NO. Estudos prévios em ratos mostraram que o NCX 4016 quando administrado intraperitonealmente ou por via oral foi capaz de liberar NO progressivamente. Além disso, o NCX 4016 e seu metabólito ativo NCX 4015 atingiram o coração, aumentando a produção de NO neste tecido (CARINI et al., 2004). De acordo com a hipótese de modulação da biodisponibilidade de NO por eritrócitos, no interior dessas células o NO preferencialmente se liga ao grupo heme livre para formar HbFe(II)NO. Este posteriormente transfere NO para β -93-Cys para formar Hb-S-Nitroso. NO bioativo é finalmente exportado para fora dos eritrócitos por meio da band 3 (ou AE1), na forma de tiols, que são abundantes no plasma e podem incorporar NO e transportá-los na circulação na forma de S-nitrosotiois bioativos (RS-NO) até o coração (PAWLOSKI et al., 2001).

Estudos em animais e humanos mostram que o NO-liberado de AINEs poupa a mucosa gastrointestinal e que diferentes dosagens de nitrofenaco, diclofenaco-NO, flurbiprofeno-NO, cetoprofeno-NO ou aspirina-NO causam significativamente menos danos na mucosa gástrica em ratos do que os AINEs padrões. (BURGAUD et al., 2002).

Até a presente data não há relatos de estudos utilizando indometacina-NO (NCX 2121) (Figura 1) e infecção por *T. cruzi* (Cepa y).

Figura 1. Fórmula estrutural do composto N-acetyl-D-cysteine-1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid, 4-(nitrooxy)butyl Ester. (NO-indometacina).



Indometacina-NO

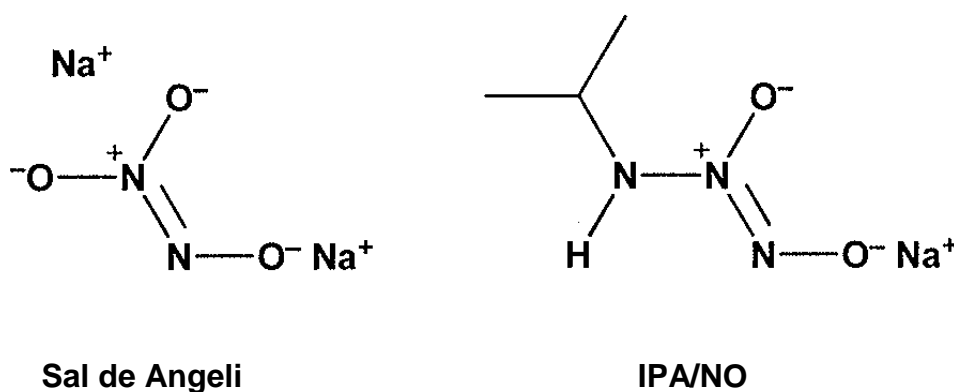
Fonte: <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10005705>.
Acesso em: 25/10/2013.

1.6 Sal de Angeli

O óxido nítrico (NO) é fisiologicamente produzido por uma família de enzimas denominadas de óxido nítrico sintases (NOS). Catalizam a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO. Há três isoformas de NOS: endotelial (eNOS), constitutível (cNOS) e induzível (iNOS) (GOW et.al., 1999). A liberação endógena de óxido nítrico desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular. De fato, o NO produzido pela NO sintase (NOS), a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina, ativa a proteína heme, guanilato ciclase solúvel (sGC), resultando num acúmulo de

monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e subsequente relaxamento dos vasos (MONCADA et al., 1991). Além disso, o NO é um inibidor da aderência e da agregação plaquetária (BUTLER et al., 1993) e provê um conceito promissor para suprimir os efeitos secundários vasculares observados com o uso de AINEs (ANNING et al., 2006, VELÁZQUEZ et al., 2008). O Nitroxil (HNO) é a forma reduzida do NO, que além de possuir as mesmas funções citadas acima, é um agente inotrópico cardíaco positivo (aumento da força de contração do coração) (PAOLOCCI et al., 2003; IRVINE et al., 2008) e um protetor contra lesão cardíaca de isquemia-reperfusão (PAGLIARO et al., 2003) além de ser resistente ao ânion superóxido (IRVINE et al., 2008).

Figura 2. Fórmula estrutural dos compostos “disodium diazen-1-ium- 1,2,2-triolate” (sal de Angeli) e sal de sódio de diazenium diolato isopropilamino (IPA/NO)



Fonte: ANDREI et al., 2010.

O sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) (Figura 2), doador de HNO, foi sintetizado pela primeira vez pelo químico italiano Angelo Angeli em 1896. Sua meia vida curta (2-3 min) e a liberação concomitante de nitrito, que por si só possui ações biológicas, lhe confere limitações. Como tal, pura e de ação mais prolongada, doadores de HNO são necessários para caracterizar as ações fisiológicas e a toxicidade potencial deste e fornecer uma plataforma para a terapêutica baseada em HNO (KEMP-HARPER, 2011).

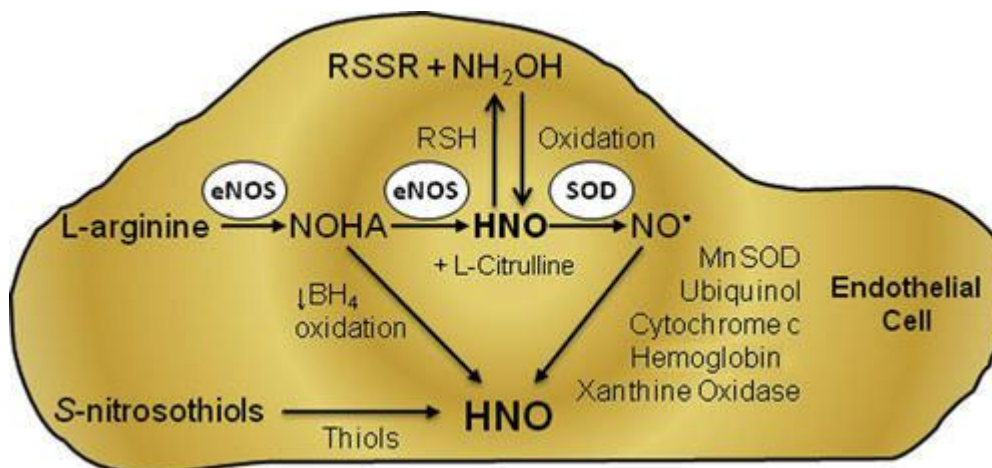
Historicamente, o Sal de Angeli tem sido o reagente de escolha para a geração de HNO, em solução aquosa. (MIRANDA et al., 2005a) Outro composto

relacionado IPA/NO (Figura 2) tem mostrado propriedades químicas e biológicas semelhantes ao sal de Angeli. (MIRANDA et al., 2005b)

Estudos bioquímicos indicam que o HNO pode ser sintetizado diretamente através da via óxido nítrico sintase dependente (eNOS) e independente (Figura 3). HNO pode ser formado diretamente pela atividade de eNOS e subsequentemente oxidado a NO^\bullet pela superóxido dismutase (SOD). A depleção de cofatores da eNOS, tetrahydrobiopterina (BH_4) ou a oxidação de intermediários da eNOS (N-hidroxil-L-arginina NOHA) ou sub-produtos (hidroxilamina NH_2OH) conduz à geração de HNO. Pode também ser formado diretamente a partir de S-nitrosotiois ou via redução enzimática do NO^\bullet (BULLEN et al., 2011).

O sal de Angeli foi capaz de diminuir a hiperalgesia mecânica em ratos Wistar quando estimulados com carragenina, LPS, citocinas e PGE_2 . Considerando que a PGE_2 é um mediador direto da sensibilidade, a inibição da hiperalgesia por sal de Angeli quando estimulada por PGE_2 indica que o HNO apresenta efeito neuronal semelhante ao assumido pelo NO (ZARPELON et al., 2013).

Figura 3. Mecanismos endógenos propostos para a produção de HNO no endotélio vascular



Fonte: BULEN et al., 2011.

Como ácido fraco, o HNO em pH fisiológico, existe na sua forma protonada (BARTBERGER et al., 2002) e sofre rápida dimerização e desidratação a óxido nítrico. Os dois principais alvos biológicos do HNO são tióis e metais que se oxidam e se reduzem, respectivamente.

1.7 Alterações hematológicas na doença de Chagas

As alterações hematológicas presentes na doença de Chagas foram notadas desde a sua descoberta onde foi relatada uma profunda anemia, durante a fase aguda, presente nas crianças infectadas (CHAGAS, 1909). Além disso, camundongos experimentalmente infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam além da anemia, trombocitopenia (CARDOSO; BRENER, 1980) e leucopenia (MARCONDES et al., 2000). Essas alterações hematológicas estão associadas a altos níveis de parasitemia, revertendo a valores normais quando a mesma é controlada, por exemplo, pelo nifurtimox, como mostrado por Marcondes e colaboradores (2000). Esses pesquisadores postularam que a anemia e a trombocitopenia durante a fase aguda da infecção pode ser consequência da supressão dos precursores mielóides.

Tribulatti e colaboradores (2005) mostraram que através da *trans*-sialidase, *T. cruzi* transfere o ácido siálico das plaquetas para suas estruturas, tornando essas células vulneráveis à captação e eliminação pelas células de Küpffer. Sabe-se que não apenas nas plaquetas, mas também nas hemácias a diminuição no conteúdo de ácido siálico resulta em redução no tempo de vida celular (STEINER; VANCURA, 1985).

A inoculação da cepa Y de *T. cruzi* em camundongos resistentes à infecção provoca, na fase aguda, anemia mais severa do que em animais susceptíveis (MALVEZI et al., 2004). Além disso, as citocinas, como o TNF- α , podem provocar efeito supressivo sobre os precursores eritroides na medula (ROODAMNN et al., 1987; MALVEZI et al., 2004) durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Em conjunto, esses resultados sugerem que as alterações hematológicas observadas podem ser consequência tanto da ação supressora dos mediadores produzidos por macrófagos durante a fase aguda (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; PINGE-FILHO et al., 1999)

quanto dos componentes da imunidade do animal infectado (MARCONDES et al., 2000).

A anemia observada durante a infecção aguda por *T.cruzi* é geralmente acompanhada por lipoperoxidação dos eritrócitos com a participação do NO (MALVEZI et al., 2004) indicando que os radicais livres resultantes do estresse oxidativo provocado tanto pelo parasita, quanto pela resposta imunológica antiparasitária, podem ter papel importante na geração da lesão dos eritrócitos.

Tatakihara e colaboradores (2008) mostraram que o desenvolvimento da anemia e da hipoplasia medular observada em camundongos C57BL/6 e BALB/c durante a fase aguda da infecção por *T.cruzi* independem das PGs. E que o tratamento de camundongos BALB/c com inibidor preferencial da COX-1 (indometacina) acentuava a reticulocitose.

1.8 Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres, são substâncias constantemente produzidas durante a respiração celular. Existe um fino balanço no organismo humano entre a produção de espécies reativas e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes, já que as ROS desempenham diversas funções fisiológicas. Entretanto, quando a capacidade de neutralização destas espécies é inferior à sua produção, instala-se no organismo uma situação denominada estresse oxidativo. A maior parte dos tecidos é capaz de tolerar níveis moderados de estresse, enquanto que níveis intensos levam a alterações metabólicas e danos às estruturas celulares, por afetar lipídeos, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Devida a sua alta reatividade, os radicais livres tem vida curta, o que torna difícil sua medição direta (HOLLEY; CHEESEMAN, 1996). Assim, a avaliação dos radicais livres é baseada na pesquisa de produtos secundários da reação com radicais livres gerados ou consumidos durante o processo.

A membrana do eritrócito contém grande número de grupamentos tióis (R-SH) que podem ser convertidos em dissulfetos (R-SSG) pelos oxidantes, levando à desnaturação das proteínas de membrana (GILBERT; MC LEAN, 1990) com

consequente lesão intracelular e oxidação da hemoglobina à metahemoglobina (RICE-EVANS; BAYSAL, 1987).

O componente lipídico da membrana do eritrócito também está sujeito ao estresse oxidativo. A lipoperoxidação, consequência do ataque de espécies reativas de oxigênio que retiram átomos de hidrogênio dos grupamentos metil dos lipídeos de membrana, pode ser medida como um indicador indireto da concentração de radicais livres.

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (GARDÈS-ALBERT et al., 1991). A reação começa com a remoção do átomo de hidrogênio do ácido graxo polinsaturado da membrana celular pelo oxidante. Essa remoção pode ser feita pelo OH^\bullet ou LO^\bullet (radical alcoxil), formando o L^\bullet (radical lipídico). O L^\bullet reage rapidamente com o O_2 formando LOO^\bullet (radical peroxil) que remove novo hidrogênio do ácido graxo formando novamente o L^\bullet e hidroperóxido lipídico (LOOH) que pode ser convertido em malondialdeído, um dos produtos finais da lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). A lipoperoxidação termina quando os radicais L^\bullet e LOO^\bullet destroem a si próprios.

A determinação dos níveis de glutathiona, e enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GSR) também pode ser um indicador dos níveis de estresse oxidativo a que o tecido está sendo submetido (WEN et al., 2004).

A habilidade de *T. cruzi* para resistir aos radicais livres está relacionada com a presença de mecanismos como a tripanotona e enzimas relacionadas que estão envolvidas na proteção contra dano causado por oxidantes, metais pesados e, possivelmente xenobióticos (FAIRLAMB, CERAMI, 1992).

Embora a atividade no controle da multiplicação do parasita seja dependente de NO, os intermediários reativos de oxigênio (ROI), tem papel importante nas lesões teciduais ocorridas durante a infecção. Modificações na estrutura do retículo endoplasmático liso, provavelmente devido à produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foram mostradas por Cecchini (1987).

O estresse oxidativo em tecidos como fígado e coração também foi constatado por DO CARMO (1995), que mostrou que os níveis de lipoperoxidação estão aumentados nesses órgãos durante a infecção experimental em camundongos.

Os experimentos de WEN e colaboradores (2004) mostraram que alterações na cadeia respiratória mitocondrial são fontes de produção de ROI nos miócitos de camundongos C3H/HeN infectados por *T. cruzi*, e que a severidade da miocardiopatia nesses animais está relacionada com o aumento no dano oxidativo, mostrado pelo aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) e proteína carbonílica, e redução dos mecanismos antioxidantes das células (por exemplo a SOD).

Os ânions superóxidos produzidos durante a infecção por *T. cruzi* também podem reagir com o NO para formar peroxinitrito (ONOO⁻) ou, pela reação de Fenton, podem gerar OH[•], dois radicais altamente reativos que podem estar associados ao dano oxidativo nos eritrócitos observado durante a infecção experimental em camundongos C57BL6 e Swiss (MALVEZI et al., 2004). Estes autores também sugerem que nesse caso o dano oxidativo no eritrócito pode ser dependente de um balanço entre os níveis de O₂^{•-} e NO[•] produzidos pelo hospedeiro. Segundo Tatakihara e colaboradores (2008) durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi* ocorre um aumento da lipoperoxidação de eritrócitos e o bloqueio de COX-2 atenua esta lipoperoxidação. Estes autores constataram ainda que o tratamento com AINES provocou redução nos níveis de NO plasmático dos camundongos infectados e no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais ativados com LPS. A somatória desses dados pode explicar os aumentos na carga parasitária no sangue e no tecido cardíaco nos animais infectados e tratados com AINES e o envolvimento do NO na lipoperoxidação em eritrócitos durante a infecção por *T. cruzi*.

É fato que os AINES são utilizados no controle da febre em pacientes chagásicos e se extrapolarmos nossos achados para a prática médica, o uso de AINES convencionais pode contribuir para o agravamento da doença de Chagas em humanos.

Até o momento não encontramos na literatura estudos sobre os efeitos de AINEs-NO na Dc. Assim, investigações que busquem esclarecer os efeitos da ação conjunta da inibição balanceada das isoformas de COX com a disponibilidade de NO por AINEs-NO e HNO (nitroxil) sobre o curso da infecção por *T. cruzi* são necessários e podem contribuir para um melhor entendimento da patogênese da doença de Chagas bem como indicar novas estratégias para o seu tratamento em humanos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar no modelo murino os efeitos simultâneos do bloqueio da produção de prostaglandinas e liberação de NO, e a liberação de HNO pelo sal de Angeli, sobre a anemia, estresse oxidativo e a miocardite que se desenvolvem na fase inicial da infecção por *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico *in vivo* com indometacina-NO (inibidor preferencial de COX-1 e liberador de NO) e sal de Angeli (HNO, doador de NO), determinando os níveis de parasitemia no sangue, o parasitismo no coração, a sobrevivência e a anemia que se desenvolve na fase inicial da infecção por *T. cruzi* em camundongos C57BL/6;
- Dosar o NO plasmático e em sobrenadante de cultura de macrófagos;
- Avaliar o estresse oxidativo por meio da determinação do consumo de oxigênio, tempo de indução (T^{ind}) e quimiluminescência (QL) e ao mesmo tempo averiguar a participação da indometacina-NO e sal de Angeli como possíveis mediadores da lesão pré-hemolítica em eritrócitos provenientes de camundongos C57BL/6 à infecção com a cepa Y de *T. cruzi*,
- Investigar os efeitos da liberação de NO pelos fármacos indometacina-NO e sal de Angeli sobre a capacidade de invasão de *T. cruzi* em macrófagos, determinando o índice de internalização e saída das formas tripomastigotas no meio de cultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

Os protocolos para a realização dos experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, processo número 28918.2012.68 e 5492.2012.22).

3.2 Animais e reagentes

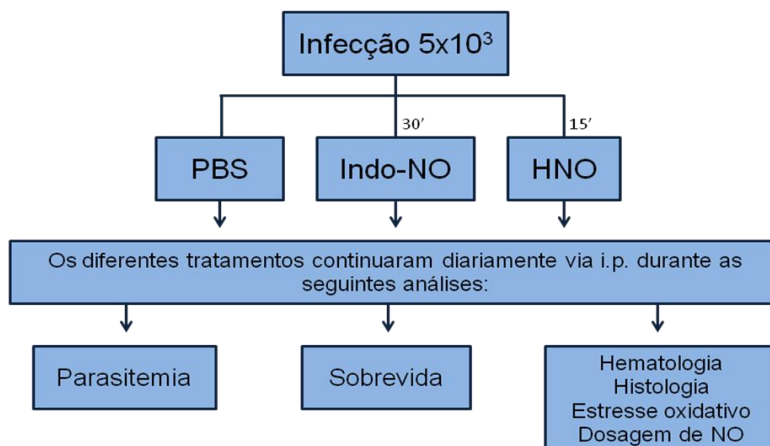
Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério de animais isogênicos do Departamento de Imunologia–CEMIB/UNICAMP. Mantidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina em gaiolas coletivas, comportando 5 animais cada. Água e ração (NUVITAL, CR1, Colombo, PR) autoclavadas foram distribuídos “ad libitum”. Nos grupos experimentais e controles, foram utilizados camundongos aproximadamente da mesma idade.

NO-Indomethacin N-acetyl-D-cysteine-1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid, 4-(nitrooxy) butyl Ester (Cayman chemical) fornecida em solução de acetato de metila, a qual foi gentilmente evaporado com gás nitrogênio e imediatamente acrescentado um solvente menos tóxico, o dimetil formamide (DMF). Foi utilizado uma concentração de 82 μM /animal (50ppm) (RAO et al., 2006) diluído em tampão fosfato pH 7,2, preparado diariamente, 30 minutos antes do tratamento, devido a sua baixa estabilidade neste tampão.

O sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ – sodium trioxodinitrate; AS) foi sintetizado e utilizado como previamente descrito (Smith e Hein, 1960). A estabilidade das soluções estoque, preparada em NaOH 10 mM e armazenado a -20°C , foi determinada a partir dos coeficientes de extinção a 250 nm (ϵ de 8000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ de sal de Angeli) (Maragos et al, 1991). Preparou-se 7 mg (sal de Angeli) / mL (NaOH 10 mM). Foram utilizadas concentrações de 6 μg , 60 e 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{animal}$ diluído em tampão fosfato pH 7,2, preparado diariamente 15 minutos antes do tratamento, devido a sua baixa estabilidade

neste tampão. Animais controles (infectados e não infectados) receberam 100 μ L de PBS pela via intraperitoneal.

Figura 4. Protocolo experimental



3.3 Parasitos e infecção

Os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.), com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (Cepa Y), obtidas por punção cardíaca de camundongos Swiss inoculados semanalmente pela via intraperitoneal com 2×10^5 formas sanguíneas, usadas para a manutenção de *T. cruzi* “in vivo”. A cepa Y de *T. cruzi* foi gentilmente cedida pelo Dr. Paulo Araújo, da Universidade de Campinas, Brasil.

3.4 Parasitemia e taxa de sobrevida

A avaliação da presença de parasitos circulantes foi realizada em dias alternados a partir do terceiro dia de infecção, pela de contagem em microscópio óptico, do número de parasitos presentes em 5 μ L de sangue coletado da cauda dos camundongos. Os resultados foram expressos em número de parasitos/mL de sangue, conforme descrito por Brener (1962). Em experimento paralelo, a taxa de sobrevida de

camundongos infectados tratados ou não com NO-indometacina, foi avaliada por 30 dias consecutivos (TATAKIHARA et al., 2008).

3.5 Coleta de sangue e obtenção de plasma

No 12º dia pós infecção, animais controles e experimentais foram anestesiados com Tiopental 40 mg/Kg via intraperitoneal e o sangue coletado por punção cardíaca. Foi utilizado ácido etilendiaminotetracético dissódico a 5% (EDTA) como anticoagulante. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue total a 1500 rpm, por 10 min a 4°C, armazenado a -20°C até a análise.

3.6 Quantificação de NO

No 12º dia pós infecção, animais dos grupos controles e experimentais foram anestesiados e o sangue coletado por meio de punção cardíaca para obtenção de plasma. A concentração de NO plasmático foi determinado por avaliação da quantidade de nitrito como descrito por Panis e colaboradores (2010). O plasma foi centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos para obtenção do sobrenadante. Alíquotas de 60 µL do plasma foram desproteinizadas por adição de 50 µL de solução de ZnSO₄ (75 mM) (Merck®), seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos. Posteriormente, 70 µL de solução de NaOH (55 Mm) (Merck®) foram adicionados em cada sobrenadante. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante final foi diluído em tampão glicina (45 g/L pH 9,7, Merck®) em uma proporção de 5:1. Grânulos de cádmio que estavam armazenados em 100 mM de solução de H₂SO₄ (Merck®) foram lavados 3 vezes em água destilada esterilizada e adicionado a uma solução de 5 mM de CuSO₄ em tampão glicina-NaOH (15 g/L Ph 9,7, Merck®) durante 5 minutos. Os grânulos de cobre revestidos de cádmio foram usados dentro de 10 minutos. O tratamento com cádmio é usado para converter todo o nitrato em nitrito em amostras biológicas, proporcionando uma estimativa mais precisa da quantidade total de NO na amostra original. Grânulos ativados (600 mg cada) foram adicionados ao tampão glicina, diluído o sobrenadante e suavemente agitados por 10 minutos. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para tubos de microcentrífuga para subsequente determinação de nitrito. Para cada tubo, o mesmo volume de reagente de

Griess foi adicionado (reagente 1: 50 mg de N-naphthylethylenediamine em 250 mL de água destilada; reagente 2: 5 g de ácido sulfanílico em 500 mL de 3 M de HCl, Sigma®). Após a incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados à 10.000 rpm por 2 minutos à 25°C. Por fim, 100 µL de cada tubo foi adicionado em triplicata em placa de 96 poços. Para determinar a concentração de nitrito na amostra, a curva de calibração foi preparada por diluição de NaNO₂ (Merck®) em água destilada esterilizada gerando concentrações que variaram de 125 a 0 µM. Cem microlitros de reagente de Griess foram adicionados nos poços das três primeiras colunas da placa de microtitulação. A absorbância foi lida em leitora de microplacas (Multiskan EX, LabSystems®, Minnesota EUA). O resultado final foi expresso em µM de nitrito.

3.7 Análise hematológica dos animais normais e infectados

Para a realização da análise hematológica, 1,0 mL de sangue de cada camundongo foi obtido através da punção cardíaca como descrito anteriormente.

Em todos os experimentos realizados para determinar os parâmetros hematológicos dos animais infectados, consideramos como valores normais, aqueles obtidos com camundongos Swiss e C57BL/6 não infectados mantidos nas mesmas condições dos grupos experimentais (MALVEZI et al., 2000).

3.7.1 Contagem do número de plaquetas

A contagem de plaquetas de camundongos (normais e infectados) foi realizada manualmente segundo Dacie e Lewis (1975). Amostras de sangue coletadas com EDTA (v=10 µL) foram transferidas para tubos de ensaio (12 x 75 mm) contendo 2,0 mL de citrato trissódico 3,8 %. A seguir, esta solução foi homogeneizada e transferida para uma câmara hematimétrica de Neubauer (Hirschmann, Techcolor), mantida por 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente antes do início da contagem em microscópio óptico (Olympus, CH30), com aumento final de 400X. O número de plaquetas foi calculado da seguinte maneira:

[Fator de diluição X Fator de profundidade = Fator final]

[Fator final x plaquetas contados em 80 quadrados menores da área central da câmara
= Plaquetas/ μ L]

3.7.2 Determinação do hematócrito (Ht)

Um pequeno volume de sangue total com EDTA foi transferido por capilaridade para um tubo capilar não graduado (Perfecta), com 75 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno, deixando vazios 15 mm. A seguir, foi selada a extremidade distante da coluna de sangue pelo calor. Logo após, as amostras obtidas foram centrifugadas por 5 minutos (5.000 r.p.m.) em microcentrífuga (microhematócrito – DMH2, Benfer do Brasil). A leitura foi realizada colocando o capilar sobre uma tabela (CELM) contendo escala apropriada, excluindo-se da leitura a camada de leucócitos e plaquetas como descrito por Bain (1997). O Ht foi expresso em porcentagem.

3.7.3 Dosagem de Hemoglobina (Hb): método da cianometahemoglobina

A dosagem da hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina como descrito por Bain (1997). Em tubos de ensaio (15 X 100 mm) foram colocados 2,5 mL do reagente de Drabkin (Analisa Diagnóstica). Um dos tubos foi utilizado como branco, em outros três tubos foram colocados 10 μ L de sangue hemolisado com concentrações diferentes conhecidas que foram utilizadas como padrão, para ser determinado o fator de calibração. E nos outros tubos foram colocados 10 μ L das amostras de sangue desconhecidas, com EDTA, previamente homogeneizadas, onde ocorrem as seguintes reações:

a) Transformação do ferro da hemoglobina em ferricianeto, formando a metahemoglobina que por sua vez, b) combina-se com o cianeto de potássio e produz o pigmento estável, a cianometahemoglobina. Esta pode então ser quantificada pela absorção da luz em 540 nm, em espectrofotômetro. A comparação da leitura feita pelo instrumento das absorbâncias das amostras com a absorbância da solução de referência (padrão) permite calcular a Hb, o que foi feito da forma mais conveniente

com uma curva padrão ou uma tabela de conversão. A concentração de Hb foi expressa em g/dl. Os cálculos foram realizados conforme a equação abaixo:

3.7.3.1. Cálculo para o fator de calibração:

$$\frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Absorbância do Padrão}} = \text{Fator de calibração}$$

3.7.3.2 Cálculo para determinação da concentração de hemoglobina

$$\text{Concentração de Hb} = \text{Fator de calibração} \times \text{Absorbância do teste}$$

3.7.4 Análise hematológica para determinação do número de leucócitos

3.7.4.1 Contagem de leucócitos

As contagens dos leucócitos totais foram realizadas manualmente. As amostras de sangue total com EDTA previamente homogeneizadas foram diluídas no líquido de Turk (20 mL de ácido acético glacial, 1 mL de azul de cresil brilhante e água destilada q.s.p 1.000 mL) na proporção de 1:20. A solução de Turk provoca lise de células anucleadas (hemácias).

Dessa forma, utilizou-se o seguinte procedimento: em tubos de ensaio (10 X 50 mm) foram colocados 95 µL do líquido de Turk , 5 µL de sangue total com EDTA seguido de agitação lenta, deixando em repouso por 10 minutos. Após agitação, realizou-se a contagem dos leucócitos em câmara hematimétrica de Neubauer utilizando os quatro quadrantes laterais da câmara e objetiva de 40X.

3.7.4.1.1 Cálculo do número de leucócitos na câmara de Neubauer

Número de leucócitos contados nos quatro quadrados externos da câmara (64 quadrados menores) correspondente a um volume de 0,4 µL numa diluição de 1:20.

$$\text{N}^\circ \text{ de leucóцитos contados} \times \frac{1,0 \mu\text{L}}{0,4 \mu\text{L}} \times 20 = \text{leucóцитos por } \mu\text{L}$$

3.7.5 Contagem do número de reticulócitos

A contagem de reticulócitos obtidos de camundongos (normais e infectados) foi realizada manualmente. Amostras de sangue coletadas com EDTA ($v=30 \mu\text{L}$) foram transferidas para tubos tipo de microcentrífuga (1,5mL) contendo $60 \mu\text{L}$ de azul de cresil brilhante (Laborclin). A seguir, esta solução foi homogeneizada e deixada em banho-maria a 37°C por 30 min. Foi confeccionado distensão em lâmina $25,4 \times 76,2 \text{ mm}$ (Bioslide) Realizada a leitura em microscópio óptico (Olympus, CH30), com aumento final de 1.000X. E contados 5 campos de 200 células e calculado a porcentagem de reticulócitos.

3.8 Avaliação do estresse oxidativo

3.8.1 Determinação do consumo de oxigênio e tempo de indução (T^{ind}) em eritrócitos

Amostras de sangue de animais dos grupos controles e experimentais no 12º dia pós infecção, foram coletadas e os eritrócitos utilizados para a determinação do estresse oxidativo. Após três lavagens com tampão PBS 10 mM, pH 7,2, o sobrenadante foi descartado e a “papa” de eritrócitos foi mantida em banho de gelo durante a realização dos ensaios. O *t*-BHP (tert butil hidroperóxido) foi utilizado como indutor do consumo de oxigênio (para cálculo do tempo de indução $-T^{\text{ind}}$)²⁴. Uma suspensão de eritrócitos a 1% preparada pela adição de $30 \mu\text{L}$ de papa de hemácias a $3,0 \text{ mL}$ de tampão fosfato (10 mM NaCl 0,9%, pH 7,2) foi utilizada para a determinação do consumo de oxigênio. Após a incubação a 37°C os tubos contendo $3,0 \text{ mL}$ da suspensão a 1% foram transferidos individualmente para uma câmara contendo um eletrodo para medição polarográfica de oxigênio (oxímetro de Clark), mantida a 37°C (LISSI et al., 1986; BAINY et al., 1996). O início da reação se deu pela adição de $12 \mu\text{L}$ de *t*-BHP (2 mM) , possibilitando o registro do consumo de oxigênio, realizado até a estabilização da queda do consumo de oxigênio e expresso em nM.

Os dados obtidos no oxímetro foram analisados utilizando-se o programa de computador Origin (versão 6.0, Micronal) para obtenção de uma curva padrão que expressa as medidas do tempo de indução do consumo de oxigênio (T^{ind}).

3.8.2 Quimiluminescência induzida por *t*-BHP

Para a preparação da suspensão de eritrócitos, 8 μ L da papa de eritrócitos foram suspensos em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio a 37° C. Para o meio de reação (em tubos plásticos mantidos no escuro), 875 μ L desta suspensão foi acrescida de 105 μ L de tampão a 37° C e a reação foi iniciada pela adição de 20 μ L de *tert*-butil hidroperóxido 0,6 M. A leitura de quimiluminescência foi monitorada durante 20 minutos em luminômetro TD-20/20 (Turner Designs), com intervalo de detecção de 300 a 620 nm, conectado ao Spreadsheet Interface Software. A temperatura ambiente foi mantida entre 26 e 28 °C e as reações foram iniciadas em sala escura. As curvas de quimiluminescência foram plotadas através do programa Origin 6.0.

3.9 Análise histopatológica

Após a coleta de sangue no 12° dia pós infecção (dpi), os animais foram sacrificados e os corações foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% e processados para análise histológica. Lâminas contendo os cortes histológicos com 5 mm de espessura foram preparadas e coradas por hematoxilina-eosina (HE). O parasitismo cardíaco foi avaliado por contagem do número de ninhos de amastigotas/secção de coração, visualizados ao percorrer todo o campo óptico (três cortes histológicos/cada animal), em 400X de aumento final. Os resultados foram expressos como a média do número de ninhos de amastigotas/secção/coração (PANIS et al., 2010).

3.10 Internalização de *T. cruzi* por macrófagos

3.10.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos C57BL/6 (machos e fêmeas) receberam 2,0 mL de Thioglicolato 5% via intraperitoneal, cinco dias antes de cada experimento. Após serem

sacrificados foram borrifados com álcool 70% e levados ao fluxo laminar onde recebiam aplicação intraperitoneal de PBS gelado e suplementado com 2% de soro fetal bovino. A seguir o abdômen do animal foi massageado para descolamento das células e então feito uma pequena incisão com a tesoura e com uma pipeta de Pasteur esterilizada foi realizada a coleta do material e colocado em tubo de polipropileno de 15 mL e mantido em banho de gelo. Em seguida o material foi centrifugado sob refrigeração a 4 °C, por 10 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuscitado em 3 mL de RPMI suplementado com L-(+)-Glutamine 2 mM (Acros Organics), Piruvato de Sódio 1 mM (J.T Baker) L-Arginine (Sigma), Vitaminas 0,1 mM (Gibco) Aminoácidos não essenciais 0,1 mM (Gibco) Penicilina 200 U/mL (Gibco), Estreptomicina 100 µg/ 100 mL (Gibco), Gentamicina 40 mg (Neo química), Tylosin 0,01 mg/mL (Sigma) e realizado a contagem das células em hemocitômetro de Neubauer. Para os experimentos foram utilizados $2,0 \times 10^5$ células por poço.

3.10.2 Obtenção de parasitos

A cepa foi transferida do sangue de camundongos Swiss infectados mantidos no laboratório de Imunopatologia da UEL, para garrafas de cultura de 25 cm² contendo uma monocamada de células LLC-MK₂ (monkey kidney fibroblast cell line) mantidas em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma) suplementado com L-Glutamina, L-Arginina, Piruvato de Sódio, Penicilina/Estreptomicina, Gentamicina, Tylosin (Sigma), vitaminas, aminoácidos não essenciais e 5% de soro fetal bovino, e deixadas por 2 horas para infecção das células. A seguir, as células foram lavadas com PBS morno por 4 vezes para retirada do sangue e foram adicionados 5 mL de RPMI suplementado e incubadas em estufa de CO₂ a 37° C. Após a infecção, o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Para utilização das formas tripomastigotas de tecido (TCT) o meio de cultura das garrafas foi transferido para tubos de 15 mL e centrifugados a 900 rpm por 10 minutos para retirada dos restos celulares, a seguir o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm e então desprezado o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 2 mL de RPMI suplementado e realizado a contagem dos parasitos em hemocitômetro de Neubauer.

3.10.3 Tratamento dos macrófagos

Após o período de adesão em lamínulas, os macrófagos foram tratados com indometacina 20 μM , ou indometacina-NO nas concentrações de 5,0 e 2,5 μM ; ou sal de Angeli nas concentrações de 15, 30 e 60 μM por 1 hora e a seguir lavados 3 vezes com PBS morno para retirada das substâncias. Em seguida, as células foram infectadas com 1×10^6 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e incubadas por 2 horas para internalização. Após, as células foram lavadas 5 vezes para retirada dos parasitos extracelulares, as lamínulas foram coradas pelo método de Bouin/Giemsa, montadas em lâminas com Permount para a contagem do número de parasitos internalizados em 500 células, em aumento de 1.000 vezes em microscópio óptico (Nikon).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises descritas foram realizadas em duplicatas. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. As curvas de sobrevida foram obtidas por análise de regressão. As diferenças entre os grupos controle e experimentais, como também os níveis de parasitemia, foram analisados pelo teste de variância ANOVA seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer, teste de Bonferroni ou teste *t*-Student não pareado, considerando-se $p \leq 0,05$ como significativo.

5. MANUSCRITO 1



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia



Vera Lucia Hideko Tatakihara^a, Aparecida Donizette Malvezi^a, Carolina Panis^b, Rubens Cecchini^c, Nagela Ghabdan Zanluqui^a, Lucy Megumi Yamauchi^d, Maria Isabel Lovo Martins^a, Rosiane Valeriano da Silva^a, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^d, Luiz Vicente Rizzo^{e,f}, Marli Cardoso Martins-Pinge^g, Phileo Pinge-Filho^{a,*}

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

^b Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Francisco Beltrão 85.605-010, Paraná, Brazil

^c Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-970 Londrina, Paraná, Brazil

^d Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil

^e Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Albert Einstein 627-701, 2-SS Bloco A, 05651-901 São Paulo, Brazil

^f Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Brazil

^g Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2014

Received in revised form 9 December 2014

Accepted 17 December 2014

Available online 2 January 2015

Keywords:

Trypanosoma cruzi

NO-indomethacin

Oxidative stress

Macrophages

Cell invasion

Nitric oxide

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease. Approximately 8 million people are thought to be affected with this disease worldwide. *T. cruzi* infection causes an intense inflammatory response, which is critical for the control of parasite proliferation and disease development. Nitric oxide-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NO-NSAIDs) are an emergent class of pharmaceutical derivatives with promising utility as chemopreventive agents. In this study, we investigated the effect of NO-indomethacin on parasite burden, cell invasion, and oxidative stress in erythrocytes during the acute phase of infection. NO-indomethacin was dissolved in dimethyl formamide followed by i.p. administration of 50 ppm into mice 30 min after infection with 5×10^3 blood trypomastigote forms (Y strain). The drug was administered every day until the animals died. Control animals received 100 μ L of drug vehicle via the same route. Within the NO-indomethacin-treatment group, parasitemia and mortality (100%) were higher and oxidative stress in erythrocytes, anemia, and entry of parasites into macrophages were significantly greater than that seen in controls. Increase in the entry and survival of intracellular *T. cruzi* was associated with inhibition of nitric oxide production by macrophages treated with NO-indomethacin (2.5 μ M). The results of this study provide strong evidence that NO-NSAIDs potently inhibit nitric oxide production, suggesting that NO-NSAID-based therapies against infections would be difficult to design and would require caution.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and affects approximately eight million individu-

als in Latin America, of whom 30–40% either have or will develop cardiomyopathy, digestive megasyndromes, or both [1]. More recently, a major concern has been the emergence of Chagas disease in non-endemic areas such as North America and Europe due to the immigration of infected individuals [2]. This disease is characterized by two clinical phases: a short, acute phase defined by patent parasitemia and a long, progressive, chronic phase [1].

In the early stages of *T. cruzi* infection, nitric oxide (NO) and arachidonic acid metabolites could be involved in host resistance,

* Corresponding author at: Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4978; fax: +55 43 3371 4465.

E-mail address: pingefilho@uel.br (P. Pinge-Filho).

but their accumulation subsequently causes tissue damage [3]. Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 are both targets of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The relevance of these enzymes, and the bioactive lipids that they produce, are not well understood in the context of parasitic disease, although the role of eicosanoids in the pathogenesis of Chagas disease is becoming more defined [4].

A series of studies have addressed the oxidative status and antioxidant defense capabilities during the course of infection and progression of Chagas disease in human patients and experimental models [5–8]. Recently, Paiva and collaborators [9] demonstrated that oxidative stress enhances *T. cruzi* infection by a mechanism that may involve facilitating parasite access to iron. In studies involving experimental models of Chagas disease, increased levels of NO, TNF- α , and prostaglandins were shown to be associated with erythrocyte oxidative stress [6,10]. However, our understanding of the role of NO and COX pathways on oxidative stress in erythrocytes during the acute phase of *T. cruzi* infection remains incomplete.

Nitric oxide (NO)-releasing NSAIDs (NO-NSAIDs) are a newly developed group of NSAIDs, consisting of a traditional NSAID to which a group that donates NO has been covalently attached via spacers [11]. NO-indomethacin is a hybrid molecule of indomethacin (inhibitor of COX-1) and a nitric oxide (NO) donor. Therefore, this drug design combines the anti-inflammatory drug (NSAID) with the effect of NO.

In this study, we aimed to investigate the impact of NO-indomethacin on parasite burden and oxidative stress in erythrocytes during the acute phase of *T. cruzi* infection.

2. Material and methods

2.1. Animals, parasites, and experimental infection

Female and male C57BL/6 mice, 6–8 weeks old, were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB/UNICAMP), University of Campinas (Campinas, Brazil), and maintained under standard conditions in the animal house of the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, State University of Londrina. A commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Quimtia-Nuvital, Colombo, Paraná, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*.

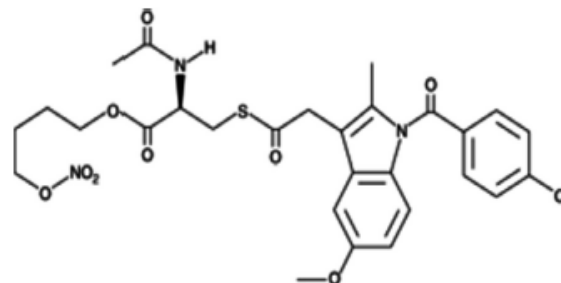
Groups of four and five mice were infected with blood-derived *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain, 5,000 parasites/animal, intraperitoneally). Animals were sacrificed during acute infection [12 or 35 days post-infection (dpi)]. For *in vitro* experiments, we used trypomastigotes grown and purified from a fibroblast cell line (LLC-MK2).

2.2. NO-NSAID

NO-indomethacin (NCX 2121; *N*-acetyl-D-cysteine-1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1*H*-indole-3-acetic acid, 4-(nitrooxy) butyl ester) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) (Fig. 1). NO-indomethacin is sparingly soluble in aqueous buffers. For maximum solubility in aqueous buffers, NO-indomethacin was first dissolved in dimethyl formamide (DMF), purged with nitrogen and then diluted with PBS (solubility of approximately 0.5 mg/mL in a 1:1 solution of DMF-PBS, pH 7.2) using this method. The following NO-indomethacin was diluted only in PBS to obtain the desired concentrations.

2.3. Treatment of mice with NO-indomethacin

Mice were treated daily with a dose of 100 μ L of 50 ppm NO-indomethacin/mouse intraperitoneally for 12 days. Mice were



NO-indomethacin

Fig. 1. NO-indomethacin (*N*-acetyl-D-cysteine-1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1*H*-indole-3-acetic acid, 4-(nitrooxy) butyl ester). NO-indomethacin is a hybrid molecule of indomethacin and a nitric oxide (NO) donor.

distributed in four groups: non-infected/non-treated (NI-NT), infected/non-treated (I-NT), non-infected/treated (NI-T) and infected/treated (I-T). The dose chosen for these experiments was based on previously published studies demonstrating its efficacy [12] and was administered 30 min after *T. cruzi* infection. Control mice received phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM sodium phosphate, 0.9% NaCl, pH 7.4) alone.

2.4. Parasitemia and survival rates

Blood parasitemia was assessed under standardized conditions by direct microscopic observation at 400 \times magnification of 50 fields using 5 μ L of heparinized tail vein blood on alternate days from the third day after *T. cruzi* infection. Data are expressed as the number of parasites/mL [13]. Survival rates of control and experimental groups of mice were evaluated daily until 35 dpi; clinical signs (body weight, hackle hair, diarrhea, lethargy, and paralysis) were recorded. Mice that showed clinical signs of severe illness prior to the end of the study were immediately euthanized by cervical dislocation, in accordance with the Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEAU-UEL).

2.5. Hematological analysis

Whole blood was collected under general anesthesia by intracardiac puncture with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) needles and syringes. The animals were sacrificed by cervical dislocation and hearts were removed. Leukocytes, platelets, and reticulocytes were counted by standard methods [14]. In each case, the plasma was separated and stored at -20°C until used. Hematocrits were obtained by microcentrifugation of capillary tubes filled with blood. The total number of nucleated cells collected was determined using a manual hemocytometer.

2.6. Measurements for oxidative stress

2.6.1. Determination of oxygen uptake and induction time in erythrocytes

Blood samples from controls and experimental groups of mice (day 12 post-infection) were used for erythrocyte oxidative stress determinations. After removal of plasma and white cells from whole blood, the remaining erythrocytes were washed three times with PBS and then resuspended in the same buffer (1:99, v/v). Oxygen uptake induced by 2 mM *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BHT) and induction time (T^{ind}) were measured with a Clark-type oxygen electrode at 37°C [6,14]. The T^{ind} is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity, while oxygen uptake is an

indirect measure of the susceptibility of erythrocyte membranes to lipid peroxidation elicited by *t*-BHT [6,10].

2.6.2. *Tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence*

Mouse erythrocytes from different experimental groups were pelleted by centrifugation (800×*g*, 10 min) at 25 °C and then washed three times with PBS. A 1% erythrocyte suspension was prepared with PBS at the moment of use. The chemiluminescence (CL) reaction was initiated by the addition of 20 μL *t*-BHT at a final concentration of 0.6 mM in 1 mL [15,16]. CL was measured in a Luminometer TD20/20 (Turner Biosystems, Sunnyvale CA, USA), and the results are expressed as relative light units (RLU). The integrated area under the curve was used as the relative amount of lipid hydroperoxide pre-existing in erythrocyte membranes.

2.7. *Cardiac parasitism*

On day 12 of infection, NO-indomethacin-treated and PBS-treated control mice were sacrificed. The heart was removed, fixed in 10% buffered formalin, and then sectioned. Sections were paraffin embedded, stained with hematoxylin/eosin (H&E), and then analyzed by light microscopy. The number of parasite nests was counted in 50 microscope fields (400× magnification) per tissue section. Three sections were evaluated and the data are expressed as the mean of the three sections.

2.8. *Macrophage culture*

Mice were inoculated intraperitoneally with 2 mL of 5% thioglycollate and, 4 days later, the elicited cells from the peritoneal exudates were harvested in cold PBS. Mouse peritoneum was washed with 5 mL ice-cold, serum-free RPMI. Peritoneal cells from 3 to 6 mice were pooled and left to adhere in complete medium (RPMI, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 40 μg/mL gentamicin, and 10 mM HEPES) for 24 h in 24-well plates at 2×10^5 cells/well. Each suspension of pooled peritoneal cells was plated in triplicate wells. Then, non-adherent cells were washed away and adherent cells received complete medium. The macrophages were plated onto 13 mm round glass coverslips and washed in warm PBS before the interaction assays. In addition, macrophages were plated onto 96-well dishes at 2×10^5 /well.

2.9. *Treatment of macrophages with NO-indomethacin and macrophage invasion assay*

Before the experiments, previously washed peritoneal macrophages were incubated for 30 min at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in the presence of NO-indomethacin (2.5 μM) to test its effect on internalization of the parasite into the host cell. After incubation, the medium containing NO-indomethacin was removed, and macrophages were allowed to interact with trypomastigotes added at a ratio of 5 parasites per cell. The interaction was allowed to proceed for 2 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were then washed three times, fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) stain, and observed with a light microscope at 1000× magnification. As a positive control for inhibiting *T. cruzi* infection, some macrophages were incubated with 20 μM indomethacin.

The internalization index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell [17,18]. All internalization indices were normalized to that of untreated macrophages. Experiments were performed in triplicate, and six independent experiments were completed. All experiments included untreated, infected peritoneal macrophages as controls. The quantification was carried out using light microscopy in which 500 cells were randomly counted. The viability

of the cells obtained from the cultures before and after incubation experiments was determined using an MTT (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) assay, which indicates the mitochondrial activity of living cells. The culture medium was aspirated, and MTT (0.5 mg/mL) was added to the cells prior to incubation at 37 °C for 4 h. H₂O₂ (1 mM) was used as negative control. The supernatant was aspirated, dimethyl sulfoxide (Sigma–Aldrich) was added to the wells to dissolve insoluble formazan crystals, and the plates were read using a Bio-Rad multiplate reader (Hercules, CA, USA), at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm.

2.10. *NO quantification*

Nitric oxide (NO) concentration in plasma obtained from control and infected mice (day 12) was estimated by measuring nitrite as describe by Navarro-Gonzalez et al. with some modifications [19]. Aliquots (60 μL) of plasma were deproteinized by adding 50 μL of 75 mM ZnSO₄ solution (Merck), followed by vortexing and centrifuging at 10,000 rpm for 2 min at 25 °C. Following this, 70 μL of a 55 mM NaOH solution (Merck) was added to each supernatant. Samples were vortexed and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 25 °C. The final supernatants were recovered and diluted in glycine buffer solution (45 g/L pH 9.7, Merck, Germany) at a buffer to supernatant ratio of 5:1.

Cadmium granules (Fluka, Poland) stored in 100 mM H₂SO₄ solution (Merck, Germany) were rinsed 3 times in distilled sterile water and added to a 5 mM CuSO₄ solution in glycine–NaOH buffer (15 g/L, pH 9.7, Merck, Germany) for 5 min and the copper-coated cadmium granules were used within 10 min. Cadmium treatment is used to convert all nitrate into nitrite in biological samples, thus providing a more accurate estimation of total NO in the original samples. Activated granules (600–1000 mg, approximately 1–2 granules) were added to glycine-buffered, diluted supernatants and gently stirred for 10 min. Aliquots of 200 μL were transferred into microfuge tubes for subsequent nitrite determination. To each tube, 200 μL of Griess reagent was added (Reagent I: 50 mg of *N*-naphthylethylenediamine in 250 mL of distilled water; reagent II: 5 g of sulfanilic acid in 500 mL of 3 M HCl, Sigma–Aldrich). After an incubation of 10 min at room temperature, tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 2 min at 25 °C. Finally, 100 μL from each tube was added to triplicate wells in a 96-well microplate.

To determine sample nitrite concentration, a calibration curve was prepared by diluting NaNO₂ (Merck) in distilled sterile water to create concentrations ranging from 125 to 0 μM. Griess reagent (100 μL) was added in triplicate to the wells of the first three columns of each microtiter plate. The absorbance was read at 550 nm using a LabSystems Multiskan EX microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and the final results are expressed in μM nitrite.

Production of NO by macrophages was determined by measuring the level of accumulated nitrite, a metabolite of NO in the culture supernatant using Griess reagent. After 48 h of treatment with NO-indomethacin, the culture supernatants were collected and mixed with an equal volume of Griess reagent in 96-well culture plates and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 550 nm and nitrite concentrations were calculated by reference to a standard curve generated by known concentrations of sodium nitrite.

2.11. *Statistical analysis*

Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with the Bonferroni's multiple comparison test and the Mann–Whitney Test. Values are presented as the mean ± standard error of mean (SEM). The results were considered significant when $P < 0.05$. Sta-

tistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Effect of NO-indomethacin on parasitemia and survival of *T. cruzi*-infected mice

The parasitemia curves of *T. cruzi*-infected mice that had either been treated with NO-indomethacin (the I-T group) or had received no treatment (the I-NT group) are shown in Fig. 2A. Six days following inoculation with *T. cruzi*, parasitemia was similar between the two groups. Parasitic load in the blood between 7 and 11 dpi was significantly higher in mice from the I-T group than in mice from the I-NT group (Fig. 2A, $P < 0.05$). There were large and statistically significant differences ($P < 0.01$) in survival between the two groups (Fig. 2B). It was observed that 100% of the animals in the I-NT group survived, while all mice in the I-T group died on day 27 (†), with mortality beginning at 21 dpi (Fig. 2B). Parasitic load in the blood between 24 and 27 dpi was significantly higher in mice from the I-T group than in mice from the I-NT group (Fig. 2A, $P < 0.05$). Cardiac parasitemia in mice from the I-NT group was not significantly different from that in mice from the I-T group (Fig. 2C, $P > 0.05$).

3.2. Effect of treatment with NO-indomethacin on anemia, thrombocytopenia, and leukopenia during acute infection with *T. cruzi*

We conducted blood cell counts and measured several hematological values in uninfected and *T. cruzi*-infected mice at 12 dpi. Based on significant decreases in hematocrit (Fig. 3A) and hemoglobin (Fig. 3B), we concluded that all mice suffered from anemia. The severity of anemia was greater in mice from the I-T group than in mice from the I-NT group (Fig. 3A and B, $P < 0.05$). Treatment with NO-indomethacin did not affect the extent of leukopenia and thrombocytopenia that developed 12 dpi (Fig. 3C and D). Surprisingly, the number of reticulocytes in mice from the I-T group was substantially higher than that in mice from the I-NT group (Fig. 3E, $P < 0.05$).

3.3. NO-indomethacin increases oxidative stress

Oxygen uptake by erythrocytes is directly associated with the susceptibility of the erythrocyte membrane to lipid peroxidation elicited by *t*-BHP and is proportional to previous oxidative stress experienced by erythrocytes *in vivo*. The oxygen uptake by erythrocytes from infected mice was associated with a significant increase in oxygen uptake at 12 dpi (Fig. 4A). NO-indomethacin treatment enhanced oxygen uptake in the I-T group (Fig. 4A, $P < 0.05$).

T^{ind} is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity of erythrocytes. *T. cruzi* infection (day 12) resulted in a significant reduction in T^{ind} (Fig. 4B, $P < 0.05$). Treatment with NO-indomethacin did not alter the T^{ind} ($P > 0.05$, Fig. 4B).

An increase in CL is related to previous *in vivo* oxidative stress, leading to antioxidant consumption and formation of lipoperoxides, with consequent photon emission [15,20]. The profiles of infected mice (I-NT group) displayed significantly higher levels of lipoperoxidation than the profiles of controls did (NI-NT group, Fig. 4C, $P < 0.05$). Evaluation of the I-T group revealed a significantly higher initial rate of lipoperoxidation than that shown by the controls (I-NT group), as shown in the ascending part of the curve (Fig. 4C, $P < 0.05$).

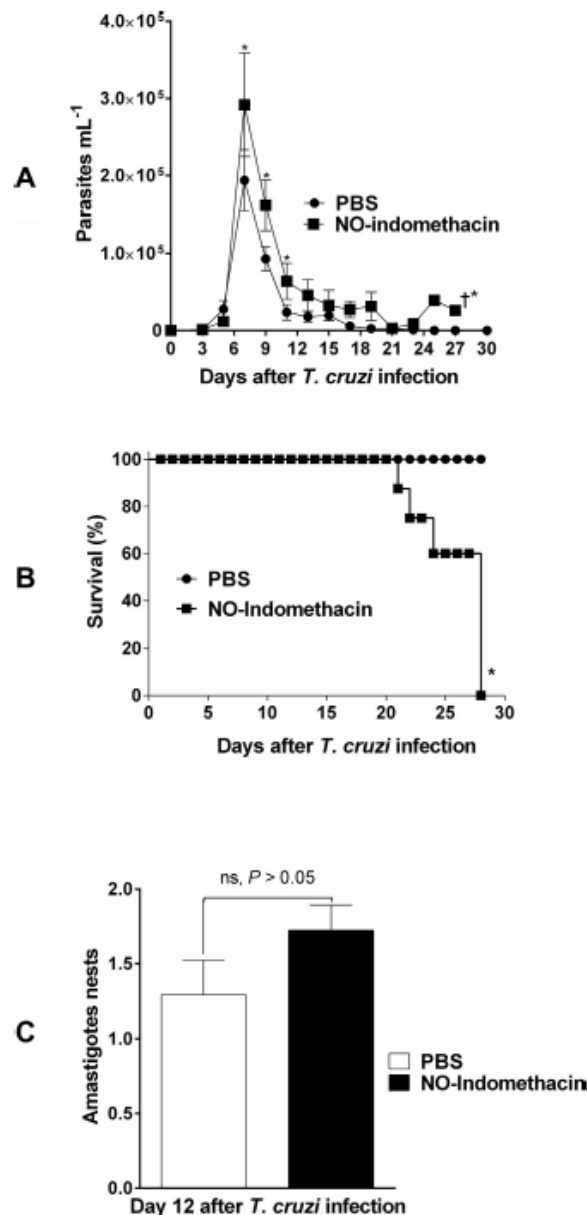


Fig. 2. Effect of NO-indomethacin on the development of *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice. (A) Parasitemia, (B) survival, and (C) number of amastigote nests in cardiac sections. Groups of five mice were infected with 5×10^3 trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain) and treated with NO-indomethacin (50 ppm/mouse). Mice received the first dose 30 min after infection and were treated until they died. Control *T. cruzi*-infected mice received PBS ($n = 5-12$). Values represent the mean \pm SEM and are representative of two independent experiments. *The difference in the parasitemia and survival rates was significant ($P < 0.05$). †all animals died.

3.4. Inhibitory effect of NO-indomethacin on nitrite levels

We investigated if the production of \cdot NO in the plasma and by macrophages was influenced by treatment of mice with NO-indomethacin. As shown in Fig. 5A, the level of nitrite in the plasma on day 12 of infection increased in comparison with that of uninfected mice. NO-indomethacin treatment reduced nitrite production

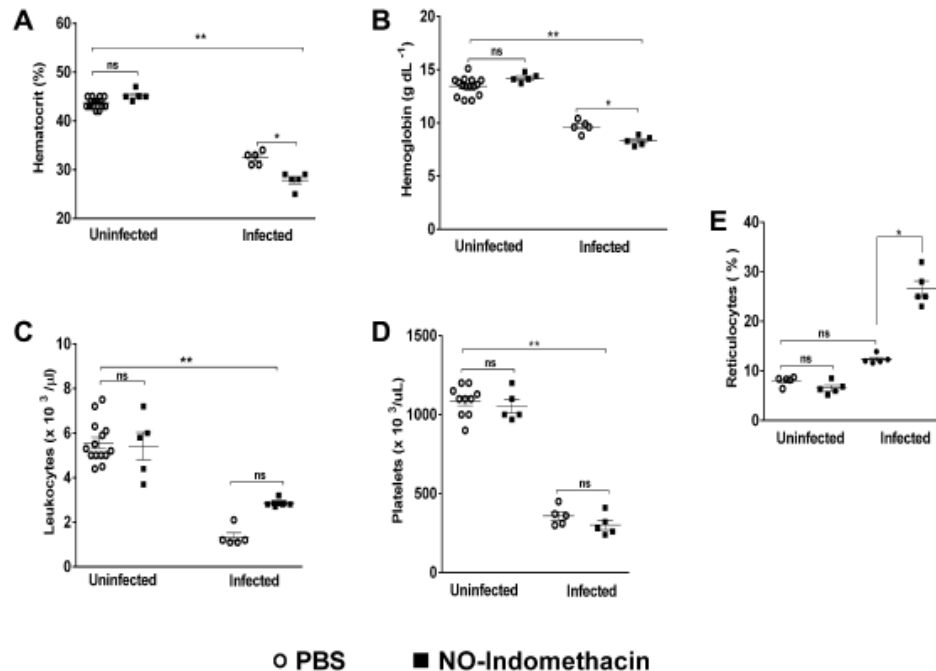


Fig. 3. Hematological values and blood cell counts in *T. cruzi*-infected mice (day 12 p.i). (A) hematocrit, (B) hemoglobin, (C) leukocytes, (D) platelets, and (E) reticulocytes. Groups of C57BL/6 mice ($n = 4-5$ /group) were infected with 5×10^3 *T. cruzi* and treated or not with NO-indomethacin (50 ppm/mouse). Values represent the mean \pm SEM and are representative of two independent experiments. ** $P < 0.05$, significantly different from values in the uninfected group. * $P < 0.05$, significantly different from values in the infected/non-treated group.

levels by 33% (Fig. 5A, $P < 0.01$). Consistent with this result, the nitrite level from infected macrophages was elevated (Fig. 5B, $P < 0.05$) and NO-indomethacin treatment decreased nitrite level by 32% in comparison with macrophages infected and not treated (15.76 μ M vs 10.62 μ M, $P < 0.05$). Taken together, the data in Fig. 5 indicate that NO-indomethacin inhibits NO production, an important cytotoxic effector for *T. cruzi*.

3.5. NO-indomethacin increases *T. cruzi* entry into macrophages

Macrophages were treated with NO-indomethacin (2.5 μ M) for 1 h, and after treatment the medium containing the drug was removed before the macrophage invasion assay in order to ensure that the treatment affected only the host cell and not the parasites. After 2 h of incubation with parasites, which provides sufficient time for them to be internalized by macrophages, the free parasites were removed. In some cases, the medium with NO-indomethacin was added every 24 h until the end of the *T. cruzi* infection period (6 days, Fig. 6C). Fig. 6A shows that the treatment markedly increased the internalization of trypomastigotes by macrophages at the concentrations tested ($P < 0.0001$). As a positive control, treatment with indomethacin (20 μ M) inhibited the internalization of trypomastigotes by macrophages. The drug cytotoxicity in macrophages was evaluated by MTT assay (Fig. 6B). NO-indomethacin did not induce cell death, as the concentration of drug used in all experiments reported were too low to cause cytotoxicity [12].

3.6. NO-indomethacin increases trypomastigote release into culture supernatants from *T. cruzi*-infected macrophages

Four days post infection, macrophages began releasing trypomastigotes into the supernatant (Fig. 6C). The release of trypomastigotes

into culture supernatants from *T. cruzi*-infected macrophages was increased by NO-indomethacin at concentration used.

4. Discussion

NO-NSAIDs are promising chemopreventive agents; unlike conventional NSAIDs, they appear to be free of appreciable adverse effects, while they retain the beneficial activities of their parent compounds [12]. However, reports on the effects of NO-NSAIDs on parasitic diseases have been somewhat limited. The results of this study provide clear evidence that in the early stages of *T. cruzi* infection, NO-indomethacin treatment increased parasitemia and reduced survival rate of infected C57BL/6 mice. In fact, pharmacological antagonists of COX-1 (aspirin) and COX-2 (celecoxib) have been found to increase mortality and parasitemia (parasite load in peripheral blood and cardiac tissue) regardless of which mouse or *T. cruzi* strains were used [10], [21–24]. Moreover, evidence suggests that administration of NSAIDs may enhance mortality in patients with Chagas disease [21]. Conversely, others have found that inhibition of prostaglandin release reduces parasitemia and extends survival of mice infected with *T. cruzi* [25–28]. This observation was often associated with a decrease in the levels of circulating inflammatory cytokines such as TNF- α , IFN- γ , and IL-10 [27]. More recently, treatment with acetylsalicylic acid during chronic infection was found to be beneficial with no increase in mortality and substantial improvement in cardiac function [24]. Our results suggest that treatment with NO-indomethacin tended to increase the number of amastigote nests in cardiac tissue, although this increase was not significantly different from the number in the control group (I-NT).

Acute infection by *T. cruzi* has been associated with significant alterations in hematological values in the blood and bone marrow

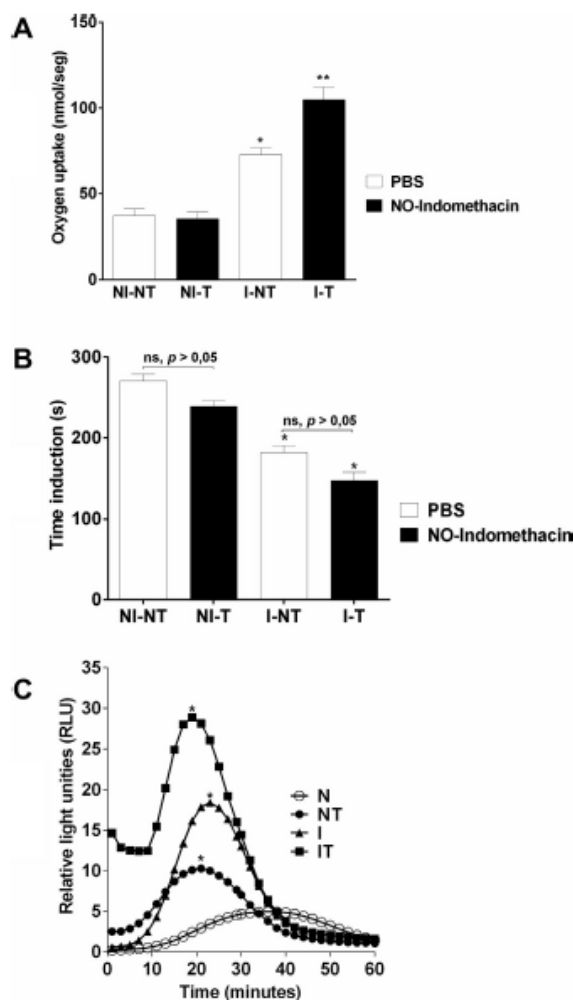


Fig. 4. Erythrocyte oxidative stress on day 12 after *T. cruzi* infection. (A) Oxygen uptake and (B) induction time, induced by *t*-butyl hydroperoxide. (C) Time course curve of *t*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence in erythrocytes from C57BL/6 mice. Groups of mice ($n = 5$ /group) were infected with 5×10^3 *T. cruzi* and treated or not with NO-indomethacin (50 ppm/mouse). Uninfected mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Values represent the mean \pm SEM and are representative of two independent experiments. ** $P < 0.05$, significantly different from values in the infected/non-treated group. * $P < 0.05$, significantly different from values in controls (uninfected/non-treated group or uninfected/treated group).

[6,29]. NO-indomethacin treatment did affect the extent of anemia but did not alter the level of leukopenia and thrombocytopenia that developed at 12 dpi. *T. cruzi* infection also is associated with a time-dependent increase in blood reticulocytes and a decrease in bone marrow erythroblasts (two markers of anemia). The changes in reticulocytes were greater in the I-T group versus the I-NT group.

Our results confirm that infection with *T. cruzi* is associated with significantly increased chemiluminescence levels in erythrocytes from C57BL/6 mice [10]. This peroxidative injury was confirmed by the increased oxygen uptake and decreased induction time in *T. cruzi*-infected mice. Interestingly, conventional NSAIDs (aspirin and indomethacin) did not affect the extent of anemia in C57BL/6 mice infected by *T. cruzi* (acute phase of infection), but

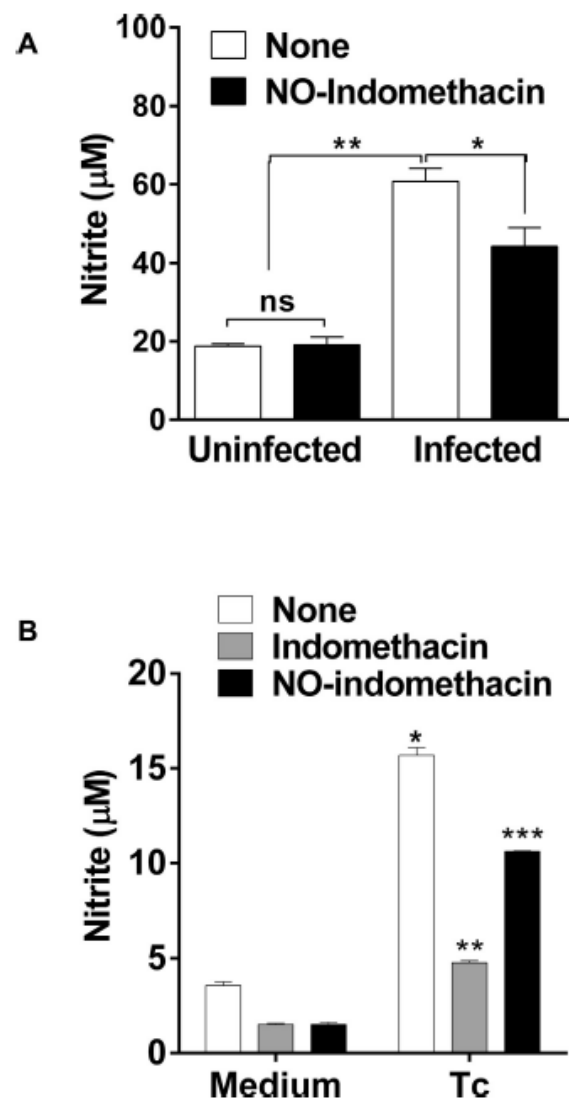


Fig. 5. Effect of NO-indomethacin on nitric oxide (NO) production. Groups of mice ($n = 5$ /group) were infected with 5×10^3 *T. cruzi* and treated or not with NO-indomethacin (50 ppm/mouse). (A) \cdot NO was estimated by measuring nitrite levels in plasma employing the cadmium-copper system followed by the Griess reaction. (B) Production of \cdot NO by macrophages was determined by measuring the level of accumulated nitrite, a metabolite of \cdot NO in the culture supernatant using Griess reagent. Values are the mean \pm SEM and is representative of two independent experiments. ** $P < 0.05$, significantly different when compared with uninfected/non-treated group. * $P < 0.05$, significantly different when compared with controls (uninfected/non-treated group or uninfected/treated group). Tc - *Trypanosoma cruzi*; Infected represents *T. cruzi*-infected mice.

reduced the levels of chemiluminescence and oxygen uptake and increased the induction time [10]. These results indicate that arachidonic acid metabolism via the cyclooxygenase pathway plays a significant role in oxidative damage in erythrocytes of C57BL/6 mice infected by *T. cruzi*. In contrast, NO-indomethacin caused an increase in oxidative stress. These data suggest that the release of \cdot NO by NO-indomethacin promotes oxidative stress in the erythrocyte membrane. In fact, in the complete absence of \cdot NO, membrane injury was greatly reduced in erythrocytes isolated from C57BL/6 iNOS^{-/-} 14 days after *T. cruzi* infection [6].

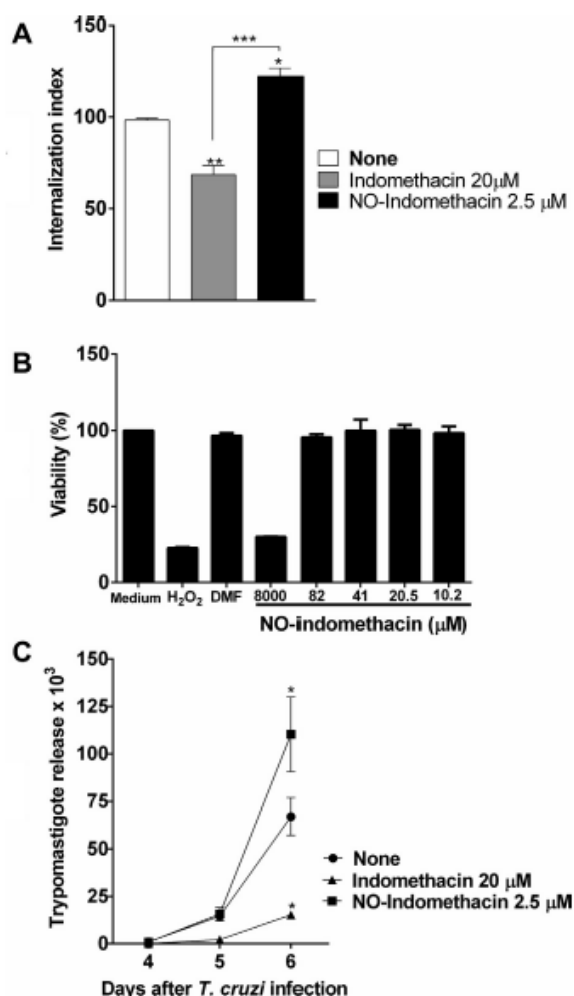


Fig. 6. Effect of NO-indomethacin on macrophage invasion by *T. cruzi*. (A) Internalization index of the interaction process between macrophages treated for 30 min with NO-Indomethacin (2.5 μM) or indomethacin (20 μM) and exposed to *T. cruzi* (5:1). (B) MTT assay to measure cell viability in macrophages after treatment with NO-indomethacin. H₂O₂ (1 mM) was used as negative control. (C) Effect of NO-indomethacin upon trypomastigote release in *T. cruzi*-infected macrophages. Cells were infected with *T. cruzi* trypomastigotes and treated daily with NO-indomethacin or indomethacin; after four days of treatment, trypomastigote release into supernatants was detected and measured until day six after infection. Values are the mean ± SEM for triplicate determination and are representative of two independent experiments. **P* < 0.0001 for a comparison with infected cell culture in medium alone. **P* < 0.05, ***P* < 0.05, significantly different when compared with controls (infected/non-treated group). ****P* < 0.05, significantly different between treated groups.

NO-indomethacin had no apparent adverse effects on the mice during their 12 days of administration at doses used in the efficacy study [12] and did not induce cell death as evaluated by MTT assay. However, its precise biotransformation remains unknown. There are no data available on the metabolism of NO-indomethacin; thus, it is difficult to speculate on how NO-indomethacin affects cyclooxygenases and nitric oxide isoenzymes in our model system. Nevertheless, COX-2 activity was significantly reduced by NO-aspirin and NO-indomethacin in azoxymethane-induced colon tumors [12]. In addition, *in vitro* studies suggest that NO-NSAIDs suppress nitric oxide synthase 2 catalytic activity as well as its protein expression [30].

To establish the role of NO-indomethacin in the process of parasite invasion, we have studied its effects on the intracellular parasitic load in *T. cruzi*-infected murine peritoneal macrophages, and our results show that NO-indomethacin (2.5 μM) increased *T. cruzi* entry into macrophages. As expected, 20 μM indomethacin reduced the parasitic load by 33% [18,31]. In addition, NO-indomethacin increased trypomastigote release into culture supernatants from *T. cruzi*-infected macrophages. The survival of *T. cruzi* can be correlated with the reduction in NO production by macrophages treated with NO-indomethacin. This reduction was also observed in plasma of infected mice treated with NO-indomethacin (12 dpi). These observations clearly illustrate that the anti-inflammatory effect of NO-indomethacin (COX inhibitor) combined with the effect of NO (NO donor) alters the immunological patterns of mice and macrophages through a reduction in NO to promote anti-*T. cruzi* activity.

Although we do not know precisely how infection causes oxidative stress in erythrocytes, we hypothesize that phagocyte-derived NO and O₂ are central to this process. O₂ can react with NO to produce ONOO⁻ or by the Fenton reaction to produce OH, both of which could lead to oxidative stress in erythrocytes [6].

In conclusion, the present results indicate that in experimental Chagas disease, oxidative stress occurs in erythrocytes, but the precise nature of this oxidative stress may depend on the balance of NO produced by the host and that released by NO-indomethacin. Our data confirm the importance of NO as part of the host's defense against *T. cruzi* infection. However, the impact of a hybrid molecule such as NO-indomethacin on blood cells and macrophages appears to be complex, and NO-NSAIDs-based therapies against infections are therefore difficult to design and demand caution.

Ethical standards

All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals. The protocols were approved by the Research and Ethics Committee of the State University of Londrina (process 13269/2013-01) and carried out in accordance with its guidelines. All efforts were made to minimize suffering during surgical procedures.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Transparency Document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

We thank J.A. Vargas for excellent technical assistance, P.M.F. Araujo for providing the *T. cruzi* (Y strain), CNPq (Edital Universal 14/11 – 474792/2011-0, 306497/2013) and Fundação Araucária (Convênio 301/2011-22364) supported this work. M.I. Lovo-Martins and R.V. da Silva received scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). LVR and PPF received research fellowships from CNPq.

References

- [1] A. Rassi Jr., A. Rassi, J. Marcondes de Rezende, American trypanosomiasis (Chagas disease), *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26 (2012) 275–291.
- [2] G.A. Schmunis, Z.E. Yadon, Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem, *Acta Trop.* 115 (2010) 14–21.

- [3] R.L. Cardoni, M.I. Antunez, Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections, *Mediators Inflamm.* 13 (2004) 235–240.
- [4] F.S. Machado, S. Mukherjee, L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, A.W. Ashton, Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection, *Adv. Parasitol.* 76 (2011) 1–31.
- [5] J.J. Wen, G. Vyatkina, N. Garg, Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 1821–1833.
- [6] A.D. Malvezi, R. Cecchini, F. de Souza, C.E. Tadokoro, L.V. Rizzo, P. Pinge-Filho, Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41 (2004) 69–77.
- [7] M.A. Zacks, J.J. Wen, G. Vyatkina, V. Bhatia, N. Garg, An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress, *An. Acad. Bras. Cienc.* 77 (2005) 695–715.
- [8] M. Dhiman, E.S. Nakayasu, Y.H. Madaiah, B.K. Reynolds, J.J. Wen, I.C. Almeida, N.J. Garg, Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease, *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 728–740.
- [9] C.N. Paiva, D.F. Feijo, F.F. Dutra, V.C. Carneiro, G.B. Freitas, L.S. Alves, J. Mesquita, G.B. Fortes, R.T. Figueiredo, H.S. Souza, M.R. Fantappie, J. Lannes-Vieira, M.T. Bozza, Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 2531–2542.
- [10] V.L. Hideko Tatakahara, R. Cecchini, C.L. Borges, A.D. Malvezi, V.K. Graca-de Souza, S.F. Yamada-Ogatta, L.V. Rizzo, P. Pinge-Filho, Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52 (2008) 47–58.
- [11] K. Takeuchi, H. Mizoguchi, H. Araki, Y. Komoike, K. Suzuki, Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing indomethacin, NCX-530, in experimental animals, *Dig. Dis. Sci.* 46 (2001) 1805–1818.
- [12] C.V. Rao, B.S. Reddy, V.E. Steele, C.X. Wang, X. Liu, N. Ouyang, J.M. Patolla, B. Simi, L. Kopelovich, B. Rigas, Nitric oxide-releasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxymethane-treated rats: effects on molecular targets, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1530–1538.
- [13] Z. Brener, Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4 (1962) 389–396.
- [14] E. Lissi, R. Franz, J. Cabezas, V. Fernandez, L.A. Videla, Effects of antioxidants and haemoglobin status on the t-butyl hydroperoxide-induced oxygen uptake by red blood cells, *Cell Biochem. Funct.* 4 (1986) 61–68.
- [15] B. Gonzalez Flecha, S. Udesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100.
- [16] M.F. Casado, A.L. Cecchini, A.N. Simao, R.D. Oliveira, R. Cecchini, Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 945–952.
- [17] E.S. Barrias, L.C. Reignault, W. De Souza, T.M. Carvalho, Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages, *PLoS ONE* 5 (2010) e7764.
- [18] A.D. Malvezi, R.V. da Silva, C. Panis, L.M. Yamauchi, M.I. Lovo-Martins, N.G. Zanluqui, V.L. Tatakahara, L.V. Rizzo, W.A. Verri Jr., M.C. Martins-Pinge, S.F. Yamada-Ogatta, P. Pinge-Filho, Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages, *Mediators Inflamm.* 2014 (2014) 580919.
- [19] J.A. Navarro-Gonzalez, C. Garcia-Benayas, J. Arenas, Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids, *Clin. Chem.* 44 (1998) 679–681.
- [20] C. Panis, A.C. Herrera, V.J. Victorino, F.C. Campos, L.F. Freitas, T. De Rossi, A.N. Colado Simao, A.L. Cecchini, R. Cecchini, Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy, *Breast Cancer Res. Treat.* 133 (2012) 89–97.
- [21] L. Sterin-Borda, G. Gorelik, N. Goren, S.G. Cappa, A.M. Celentano, E. Borda, Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81 (1996) 122–128.
- [22] A.M. Celentano, G. Gorelik, M.E. Solana, L. Sterin-Borda, E. Borda, S.M. Gonzalez, Cappa, PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations, *Prostaglandins* 49 (1995) 141–153.
- [23] P. Pinge-Filho, C.E. Tadokoro, I.A. Abrahamsohn, Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection, *Cell. Immunol.* 193 (1999) 90–98.
- [24] S. Mukherjee, F.S. Machado, H. Huang, H.S. Oz, L.A. Jelicks, C.M. Prado, W. Koba, E.J. Fine, D. Zhao, S.M. Factor, J.E. Collado, L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, A.W. Ashton, Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease, *PLoS ONE* 6 (2011) e16959.
- [25] G.K. Abdalla, G.E. Faria, K.T. Silva, E.C. Castro, M.A. Reis, M.A. Michelin, *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection, *Exp. Parasitol.* 118 (2008) 514–521.
- [26] C.G. Freire-de-Lima, D.O. Nascimento, M.B. Soares, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, F.G. de Mello, G.A. DosReis, M.F. Lopes, Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages, *Nature* 403 (2000) 199–203.
- [27] M.A. Michelin, J.S. Silva, F.Q. Cunha, Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *Exp. Parasitol.* 111 (2005) 71–79.
- [28] C.N. Paiva, R.H. Arras, L.P. Lessa, D. Gibaldi, L. Alves, C.N. Metz, R. Gazzinelli, A.S. Pymho, J. Lannes-Vieira, M.T. Bozza, Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 1355–1364.
- [29] M.C. Marcondes, P. Borelli, N. Yoshida, M. Russo, Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment, *Microbes Infect.* 2 (2000) 347–352.
- [30] A. Spiegel, T.R. Hundley, J. Chen, J. Gao, N. Ouyang, X. Liu, M.F. Go, G.J. Tsioulis, K. Kashfi, B. Rigas, NO-donating aspirin inhibits both the expression and catalytic activity of inducible nitric oxide synthase in HT-29 human colon cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 993–1000.
- [31] A.D. Malvezi, C. Panis, R.V. da Silva, R. Carvalho de Freitas, M.I. Martins, V.L. Tatakahara, N.G. Zanluqui, E. Cunha Neto, S. Goldenberg, J. Bordignon, S.F. Yamada-Ogatta, M.C. Martins-Pinge, P. Pinge-Filho, Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry in cardiac cell and promotes differential modulation of inflammatory response, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 6157–6164.

6. MANUSCRITO 2

Efeito do ânion nitroxil (HNO) sobre a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*

Introdução

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina. A DC é uma antropozoonose amplamente distribuída nas Américas e tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (RASSI et al., 2012). Estima-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, sendo que a maioria na América Latina onde a DC é endêmica, e que mais de 25 milhões vivam sob o risco de contrair a doença. Contudo, na última década a incidência da doença aumentou nos países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, países da Europa e do Pacífico Ocidental. Isso se deve principalmente pela mobilidade entre a população da América Latina e o resto do mundo e, embora menos frequente, se deve também por infecções através de transfusão sanguínea, transmissão vertical e doação de órgãos. Dados estatísticos indicam que somente no ano de 2008 a DC matou mais de 10 mil pessoas, sendo nesse mesmo ano a soro prevalência da DC em crianças entre 0 e 5 anos da ordem de 1/100.000 (MASSAD, 2008; CDC, 2013; WHO, 2013).

A habilidade de *T. cruzi* para resistir aos radicais livres está relacionada com a presença de mecanismos mediados pela tripanotona e enzimas envolvidas na proteção contra dano causado por oxidantes, metais pesados e, possivelmente,

xenobióticos (FAIRLAMB, CERAMI, 1992). Wilkinson e colaboradores (2000), mostraram que *T. cruzi* possui enzimas tripanotiona da família peroxiredoxina, as quais são expressas na mitocôndria e no citosol, e a superexpressão destas, resulta na resistência do parasita a agentes exógenos através da remoção de peróxidos. Durante a resposta imunológica, *T. cruzi* fica exposto a metabólitos tóxicos derivados de oxigênio e nitrogênio, sendo o NO o mais envolvido na morte do parasito (VESPA et al, 1994).

O sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$), doador de HNO (nitroxil), foi sintetizado pela primeira vez pelo químico italiano Angelo Angeli em 1896. Sua meia vida curta (2-3 min) lhe confere limitações. Porém, a liberação de nitrito possui ações biológicas. Devido a estas características e por terem ação mais prolongada, os doadores de HNO são necessários para caracterizar as ações fisiológicas e a toxicidade potencial deste e fornecer uma plataforma para a terapêutica baseada em HNO (KEMP-HARPER, 2011).

O HNO é a forma reduzida do NO, que além de possuir as mesmas funções, é um agente inotrópico cardíaco positivo (responsável pelo aumento da força de contração do coração) (PAOLOCCI et al., 2003; IRVINE et al., 2008) e um protetor contra lesão cardíaca de isquemia-reperfusão (PAGLIARO et al., 2003) além de ser resistente ao anion superóxido (IRVINE et al., 2008).

HNO é importante por ter uma perspectiva farmacológica e terapêutica no sistema cardiovascular. Há vários estudos indicando que o HNO é um fármaco quase perfeito para o tratamento de falências cardíacas (DAI et al, 1985; FEELISCH et al, 2003; FROEHLICH et al, 2008; LANCEL et al, 2009; PAOLOCCI et al, 2001; PAOLOCCI et al, 2003; TOCCHETTI et al, 2007). Sendo que a atividade do HNO no

tecido cardíaco pode ser resultado de interações de grupamentos tióis de proteínas envolvidas na sinalização de Ca^{2+} (FUKUTO; CARRINGTON, 2011).

Alguns autores relatam que o HNO tem potencial para ser utilizado preventivamente para evitar lesão de isquemia e reperfusão (PAGLIARO et al, 2003) e também já foi usado no tratamento de alcoolismo (DeMASTER et al, 1998)

Os grupamentos tióis e metais (tiol e metaloproteína) têm sido reportados como alvos primários para o HNO, resultando em oxidações reversíveis ou irreversíveis (FUKUTO; CARRINGTON, 2011).

Protozoários possuem um sistema redox baseado em grupamentos tióis os quais têm papel fundamental na sobrevivência desses parasitos. A síntese da molécula cisteína é a chave no metabolismo de alguns tióis em tripanossomatídeos e microorganismos anaeróbicos. Em tripanossomatídeos, a tripanotiona é o sistema glutationa mais comum e está envolvido na remoção de espécies reativas do oxigênio (MÜLLER et al, 2003).

Diante destas informações, decidimos investigar o papel do sal de Angeli's, doador de HNO, sobre a carga parasitária, índices hematológicos e estresse oxidativo que ocorre na infecção aguda por *T. cruzi*.

Materiais e métodos

Animais e reagentes

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas de 6 a 12 semanas de idade, obtidos do Departamento de Imunologia–CEMIB/UNICAMP, mantidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina

em gaiolas coletivas, comportando 5 animais cada. Água e ração (NUVITAL, CR1, Colombo, PR) autoclavadas foram distribuídos “ad libitum”. Nos grupos experimentais e controles, foram utilizados camundongos aproximadamente da mesma idade. Todos os procedimentos com os animais estavam de acordo com as diretrizes do Código Brasileiro para o Uso de Animais de Laboratório (CEUA/UEL, processo número 28918.2012.68 e 5492.2012.22).

O sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ – sodium trioxodinitrate; AS) foi sintetizado e utilizado como previamente descrito (Smith e Hein, 1960). A estabilidade das soluções estoque preparada em NaOH 10 mM e armazenado a -20°C , foi determinada a partir dos coeficientes de extinção a 250 nm (ϵ de $8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de sal de Angeli's) (Maragos et al, 1991). Preparou-se 7 mg (sal de Angeli's) / mL (NaOH 10 mM). Foi utilizado concentrações de 6 μg , 60 e 60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{animal}$ diluído em tampão fosfato pH 7,2, preparado diariamente 15 minutos antes do tratamento, devido a sua baixa estabilidade neste tampão. Animais controles (infectados e não infectados) receberam 100 μL de PBS pela via intraperitoneal.

Parasita e infecção

Os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.), com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y), obtidas por punção cardíaca de camundongos Swiss inoculados semanalmente pela via intraperitoneal com 2×10^5 formas sanguíneas, usadas para a manutenção de *T. cruzi* “in vivo”. A Cepa Y de *T. cruzi* (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) foi gentilmente cedida pelo Dr. Paulo Araújo, da Universidade de Campinas, Brasil.

Parasitemia e taxa de sobrevivência

A avaliação da concentração de parasitos circulantes foi realizada em dias alternados a partir do terceiro dia de infecção, através de contagem em microscópio óptico, do número de parasitos presentes em 5 μ L de sangue, coletado da cauda dos camundongos. Os resultados foram expressos em número de parasitos/ml de sangue, conforme descrito por Brener (1962). Em experimento paralelo, a taxa de sobrevivência de camundongos infectados tratados ou não com sal de Angeli, foi avaliada por 30 dias consecutivos.

Coleta de sangue e obtenção de plasma

No 12^o dia pós infecção, animais controles e experimentais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca. Foi utilizado ácido etilendiaminotetracético dissódico a 5% (EDTA) como anticoagulante. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue total a 1.500 rpm, por 10 min a 4 °C, armazenado a -20 °C até a análise.

Análise hematológica

Para a realização da análise hematológica, 1,0 mL de sangue de cada camundongo foi obtido através da punção cardíaca como descrito anteriormente. Em todos os experimentos realizados para determinar os parâmetros hematológicos dos animais infectados, consideramos como valores normais, aqueles obtidos com camundongos Swiss e C57BL/6 não infectados mantidos nas mesmas condições dos grupos experimentais (MALVEZI et al., 2004). Leucócitos, plaquetas e reticulócitos foram contados por métodos padrão (LISSI et al, 1986). A dosagem da hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina como descrito por Bain (1997). Em

cada caso, o plasma foi separado e armazenado a -20°C até serem utilizados. Hematócritos foram obtidos por microcentrifugação de tubos capilares preenchidos com 1/3 de sangue (volume total).

Quantificação de NO

No 12^o dia pós infecção, animais dos grupos controles e experimentais foram anestesiados e o sangue coletado por meio de punção cardíaca para obtenção de plasma. A concentração de NO plasmático foi determinado por avaliação da quantidade de nitrito como descrito por Panis e colaboradores (2010). O plasma foi centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos para obtenção do sobrenadante. Alíquotas de 60 μL do plasma foram desproteinizadas por adição de 50 μL de solução de ZnSO_4 (75 mM) (Merck®), seguido de agitação por vórtex e centrifugação a 10.000 rpm por 2 min. Posteriormente, 70 μL de solução de NaOH (55 mM) (Merck®) foi adicionado em cada sobrenadante. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 5 min. O sobrenadante final foi diluído em solução de tampão glicina (45 g/L pH 9,7, Merck®) em uma proporção de 5:1. Grânulos de cádmio que estavam armazenados em 100 mM de solução de H_2SO_4 (Merck®) foram lavados 3 vezes em água destilada estéril e adicionado a uma solução de 5 mM de CuSO_4 em tampão glicina-NaOH (15 g/L pH 9,7, Merck®) durante 5 min. Os grânulos de cobre revestidos de cádmio foram usados dentro de 10 min. O tratamento com cádmio é usado para converter todo o nitrato em nitrito em amostras biológicas, proporcionando uma estimativa mais precisa da quantidade total de NO na amostra original. Grânulos ativados (600-1000 mg cada) foram adicionados ao tampão glicina, diluído o sobrenadante e suavemente agitados por 10 min. Alíquotas de 200 μL foram transferidos para tubos de microcentrífuga para

subsequente determinação de nitrito. Para cada tubo, o mesmo volume de reagente de Griess foi adicionado (reagente 1: 50 mg de N-naphthylethylenediamine em 250 mL de água destilada; reagente 2: 5g de ácido sulfanílico em 500 mL de 3M de HCl, Sigma®). Após a incubação de 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados à 10000 rpm por 2 min à 25°C. Por fim, 100 µL de cada tubo foi adicionado em triplicata em placa de 96 wells. Para determinar a concentração de nitrito na amostra, a curva de calibração foi preparada por diluição de NaNO₂ (Merck®) em água destilada estéril para criar concentrações variando de 125 a 0 µM. Cem microlitros de reagente de Griess foram adicionados em triplicata nos poços das três primeiras colunas da placa de microtitulação. A absorbância foi lida em leitora padrão de microplacas (Multiskan EX, LabSystems®, Minnesota EUA). O resultado final foi expresso em µM de nitrito.

Avaliação do estresse oxidativo

Determinação do consumo de oxigênio e tempo de indução (T^{ind}) em eritrócitos

Amostras de sangue de animais dos grupos controles e experimentais no 12º dia pós infecção, foram coletadas e os eritrócitos utilizados para a determinação do estresse oxidativo. Após três lavagens com tampão PBS 10 mM, pH 7,2, o sobrenadante foi descartado e a “papa” de eritrócitos foi mantida em banho de gelo durante a realização dos ensaios. O *t*-BHP (tert butil hidroperóxido) foi utilizado como indutor do consumo de oxigênio (para cálculo do tempo de indução - T^{ind}) (LISSI et al., 1986). Uma suspensão de eritrócitos a 1% preparada pela adição de 30 µL de papa de hemácias a 3,0 mL de tampão fosfato (10 mM NaCl 0,9%, pH 7,2) foi utilizada para a determinação do consumo de oxigênio. Após a incubação a 37°C os tubos contendo 3,0

mL da suspensão a 1% foram transferidos individualmente para uma câmara contendo um eletrodo para medição polarográfica de oxigênio (oxímetro de Clark), mantida a 37°C (BAINY et al, 1996; LISSI et al, 1986)

Quimiluminescência induzida por *t*-BHP

Para a preparação da suspensão de eritrócitos, 8 µL da papa de eritrócitos foram suspensos em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio a 37° C. Para o meio de reação (em tubos plásticos mantidos no escuro), 875 µL desta suspensão foi acrescida de 105 µl de tampão a 37° C e a reação foi iniciada pela adição de 20µl de *tert*-butil hidroperóxido 0,6 M. A leitura de quimiluminescência foi monitorada durante 20 minutos em luminômetro TD-20/20 (Turner Designs), com intervalo de detecção de 300 a 620 nm, conectado ao Spreadsheet Interface Software. A temperatura ambiente foi mantida entre 26 e 28 °C e as reações foram iniciadas em sala escura. As curvas de quimiluminescência foram plotadas através do programa Origin 6.0.

Análise histopatológica

Após a coleta de sangue no 12º dpi, os animais foram sacrificados e os corações foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% e processados para análise histológica. Lâminas contendo os cortes histológicos com 5 mm de espessura foram preparadas e coradas por hematoxilina-eosina (HE). O parasitismo cardíaco foi avaliado por contagem do número de ninhos de amastigotas/secção de coração, visualizados ao percorrer todo o campo óptico (três cortes histológicos/cada animal), em 400X de aumento final. Os resultados foram expressos como a média do número de ninhos de amastigotas/secção/coração (PANIS et al, 2010)..

Cultura de macrófagos

Camundongos C57BL/6 (machos e fêmeas) receberam 2,0 mL de Thioglicolato 5% (Difco), via intraperitoneal, cinco dias antes de cada experimento. Após serem sacrificados foram borrifados com álcool 70% e levados ao fluxo laminar onde recebiam aplicação intraperitoneal de PBS gelado e suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen). A seguir o abdômen do animal foi massageado para descolamento das células e então feito uma pequena incisão com a tesoura e com uma pipeta de Pasteur esterilizada foi realizada a coleta do material e colocado em tubo de 15 mL e mantido em banho de gelo. Em seguida o material foi centrifugado sob refrigeração a 4° C, por 10 min a 2.000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 3 mL de RPMI suplementado com L-(+)-Glutamine 2 mM (Acros Organics), Piruvato de Sódio 1 mM (J.T Baker) L-Arginine (Sigma), Vitaminas 0,1 mM (Gibico) Aminoácidos não essenciais 0,1 mM (Gibico) Penicilina 200 U/mL (Gibico), Estreptomicina 100 µg/ 100 mL (Gibico), Gentamicina 40 mg (Neo química), Tylosin 0,01 mg/mL (Sigma) e realizado a contagem das células em hemocítmetro de Neubauer. Para os experimentos foram utilizados $2,0 \times 10^5$ células por poço.

Tratamento de macrófagos com sal de Angeli e ensaio de invasão de macrófagos

Após o período de adesão em lamínulas, os macrófagos foram tratados com sal de Angeli nas concentrações de 15, 30 e 60 μM por 1 hora e a seguir lavados 3 vezes com PBS morno para retirada das substâncias. Em seguida, as células foram infectadas com 1×10^6 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e incubadas por 2 horas para internalização. Após, as células foram lavadas 5 vezes para retirada dos parasitos extracelulares, lamínulas foram coradas pelo método de Bouin/Giemsa, montadas em lâminas com Permount para a contagem do número de parasitos internalizados em 500 células, em aumento de 1.000 vezes em microscópio óptico (Nikon).

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. As diferenças entre os grupos controle e experimentais, como também os níveis de parasitemia, foram analisados pela análise de variância ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer, teste de Bonferroni ou test *t*-Student não pareado, considerando-se $p \leq 0,05$ como significativo.

Resultados e Discussão

Efeito do tratamento com sal de Angeli sobre a parasitemia de camundongos infectados

Nossos dados mostram que camundongos C57BL/6 infectados e tratados com o fármaco doador de nitroxil (HNO) nas concentrações de 60 µg e 600 µg/kg/animal, tiveram uma redução na carga parasitária sanguínea no dia 7 pós infecção (Figura 1B e 1C). Silva e colaboradores (2007), ao tratarem camundongos Swiss com Rutênio doador de NO, também observaram redução da carga parasitária sanguínea. Em 2010, Silva e colaboradores, utilizando novos complexos de Rutênio como fármacos doadores de NO para tratamento de camundongos BALB/C, também observaram diminuição na parasitemia. Em 2009, Silva e colaboradores relataram que a melhora na taxa de sobrevivência dos animais tratados com NO- Rutênio é dose dependente, sendo a concentração de 400-nmol/kg a melhor dose. Pavanelli e colaboradores (2011) relataram que camundongos BALB/C tratados com NO- Rutênio e infectados com *P. brasilienses* apresentaram um aumento na taxa de sobrevivência quando comparados com controles.

Os dados de parasitemia obtidos corroboram com os autores acima citados. Contudo, o tratamento diário com o sal de Angeli, doador de HNO (com função semelhante ao NO), provoca um feedback negativo na produção de NO. Esses dados foram observados por Colasanti e colaboradores (1995) e por Togashi e colaboradores (1997), os quais sugerem que o NO tem efeito inibitório na expressão de iNOS. E que o NO exógeno exerce esse efeito inibitório sobre expressão de mRNA para iNOS. NO exerce um efeito bifásico sobre a transcrição de iNOS. Baixas concentrações de NO (tais como os que ocorrem no início da estimulação dos macrófagos pelas citocinas)

ativam o NF- κ B e aumentam a expressão de iNOS (feedback positivo). Altas concentrações têm o efeito oposto, o que pode prevenir a superprodução de NO. (UMANSKY et al., 1998; CONNELLY et al., 2001). Portanto, carga parasitária tanto sanguínea (Figura 1B e 1C) quanto a tecidual (Figura 2) foi reduzida.

Efeito do tratamento com sal de Angeli sobre o parasitismo cardíaco

A Figura 2 mostra o número de ninhos amastigotas no tecido cardíaco. O tratamento com sal de Angeli na concentração de 60 μ g provocou uma redução acentuada no número de ninhos, enquanto que os tratamentos com 6 μ g e 600 μ g mostraram tendência para redução no número de ninhos, porém estatisticamente não foram diferentes dos animais controles infectados e tratados com PBS. Silva e colaboradores (2007, 2009), relataram a ausência dos ninhos de amastigotas (nenhum ninho foi encontrado) no tecido cardíaco de camundongos Swiss infectados e tratados com NO-Rutênio. Em 2010 os mesmos autores mostraram que o tratamento com novos compostos de Rutênio reduziram o número de ninhos de amastigotas em tecido cardíaco.

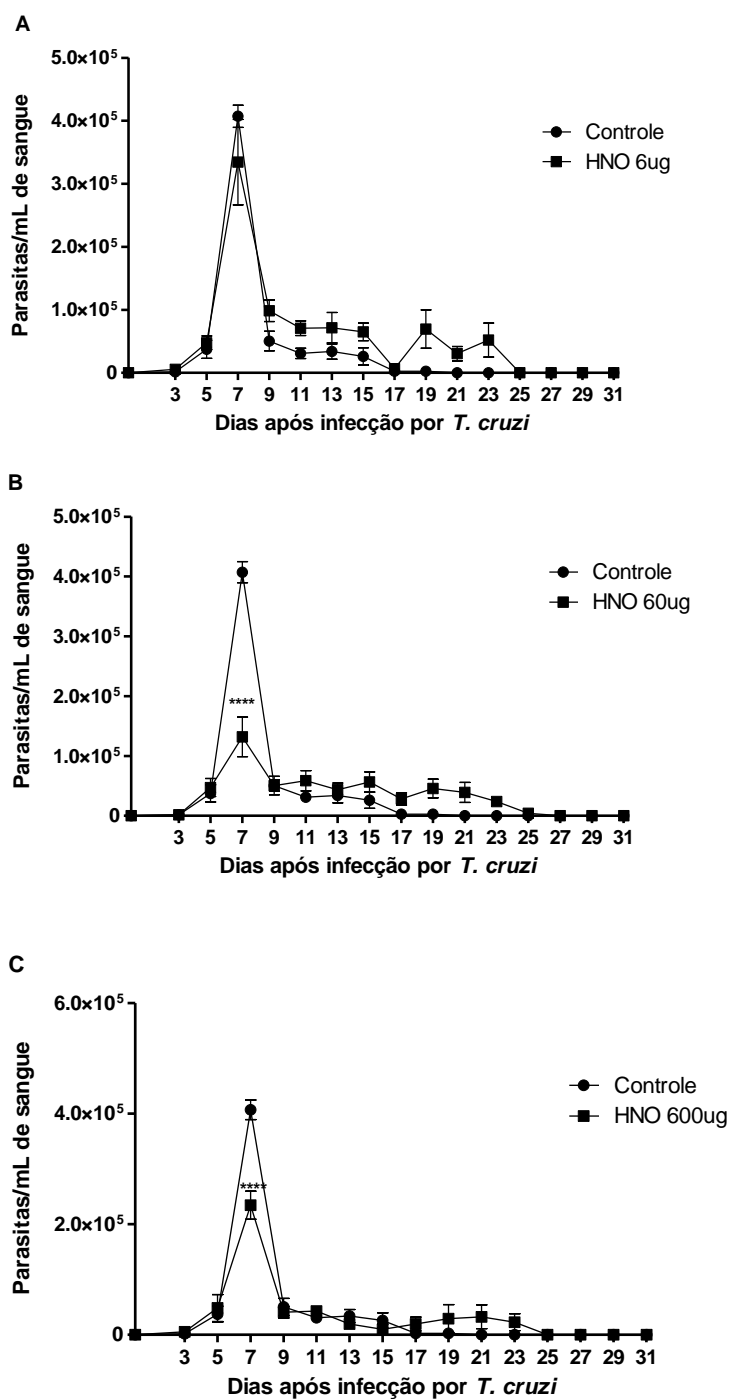


Figura 1. Efeito do tratamento com sal de Angeli (AS) sobre a parasitemia (A) de camundongos infectados por *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados por *T. cruzi* cepa Y (5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas) e tratados intraperitonealmente ou não com AS (6 μ g, 60 e 600 μ g/Kg/animal). Camundongos controles receberam PBS pela mesma via. Os dados representam a média \pm erro padrão de dois experimentos independentes (10 animais/grupo).

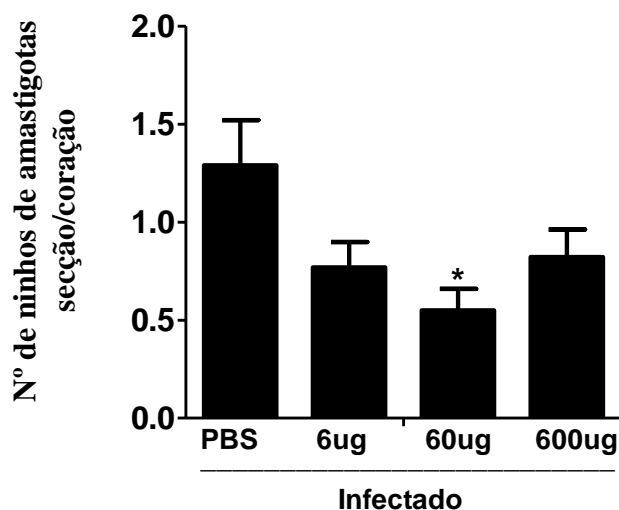


Figura 2. Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco após 12 dias de infecção. Os dados foram determinados como a média \pm erro padrão para três secções do coração e são representativos de dois experimentos independentes.

Tratamento com sal de Angeli provocou uma queda na produção de óxido nítrico (NO) em camundongos infectados por *T. cruzi*

Diante dos resultados obtidos, decidimos investigar o efeito do tratamento com sal de Angeli sobre a produção de óxido nítrico (NO) no plasma (Figura 3A) e no sobrenadante de cultura de macrófagos (Figura 3B). A avaliação da produção de NO plasmático e no sobrenadante de cultura revelou que o tratamento com sal de Angeli nas concentrações de 60 e 600 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{animal}$ provocou uma diminuição significativa na produção de NO plasmático (dia 12 pós-infecção, Figura 3 A, $p < 0.05$) e também no sobrenadante de cultura de macrófagos (24 h) nas concentrações de 30 μM e 60 μM (Figura 3B $p < 0,05$). Entretanto, Pavanelli e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento de camundongos BALB/C com NO-Rutênio e infectados com *P. brasiliensis*, apresentaram um aumento na produção de NO no 40º dia pós infecção. A redução de NO observada nos nossos experimentos, sugerem que o tratamento diário com o sal de

Angeli, doador de HNO, provoca uma regulação negativa na produção de NO. Este tem efeito inibitório na expressão de iNOS (COLASANTI et al, 1995; TOGASHI et al, 1997). E a adição de NO exógeno pode exercer esse efeito inibitório sobre expressão de mRNA para iNOS, exercendo um efeito bifásico sobre a transcrição de iNOS (UMANSKY et al., 1998; CONNELLY et al., 2001).

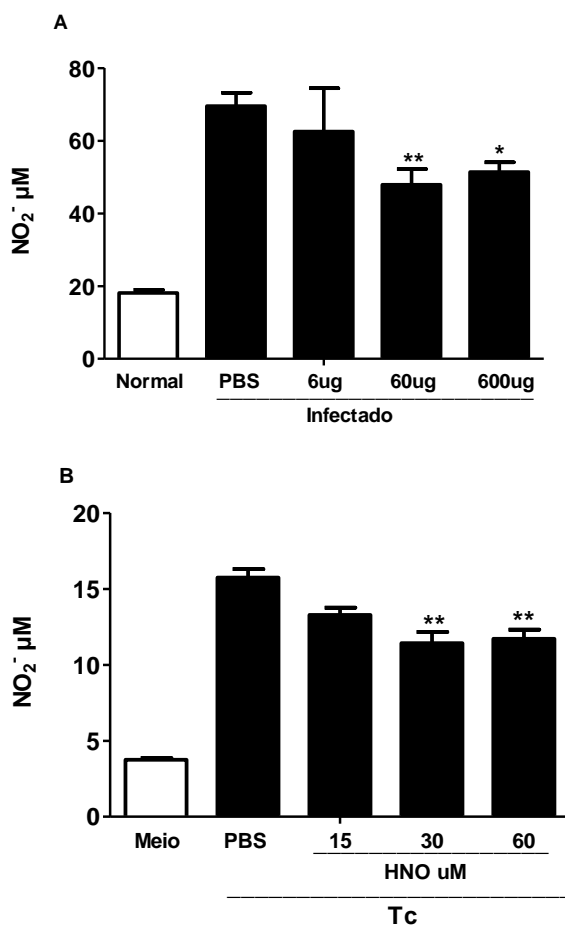


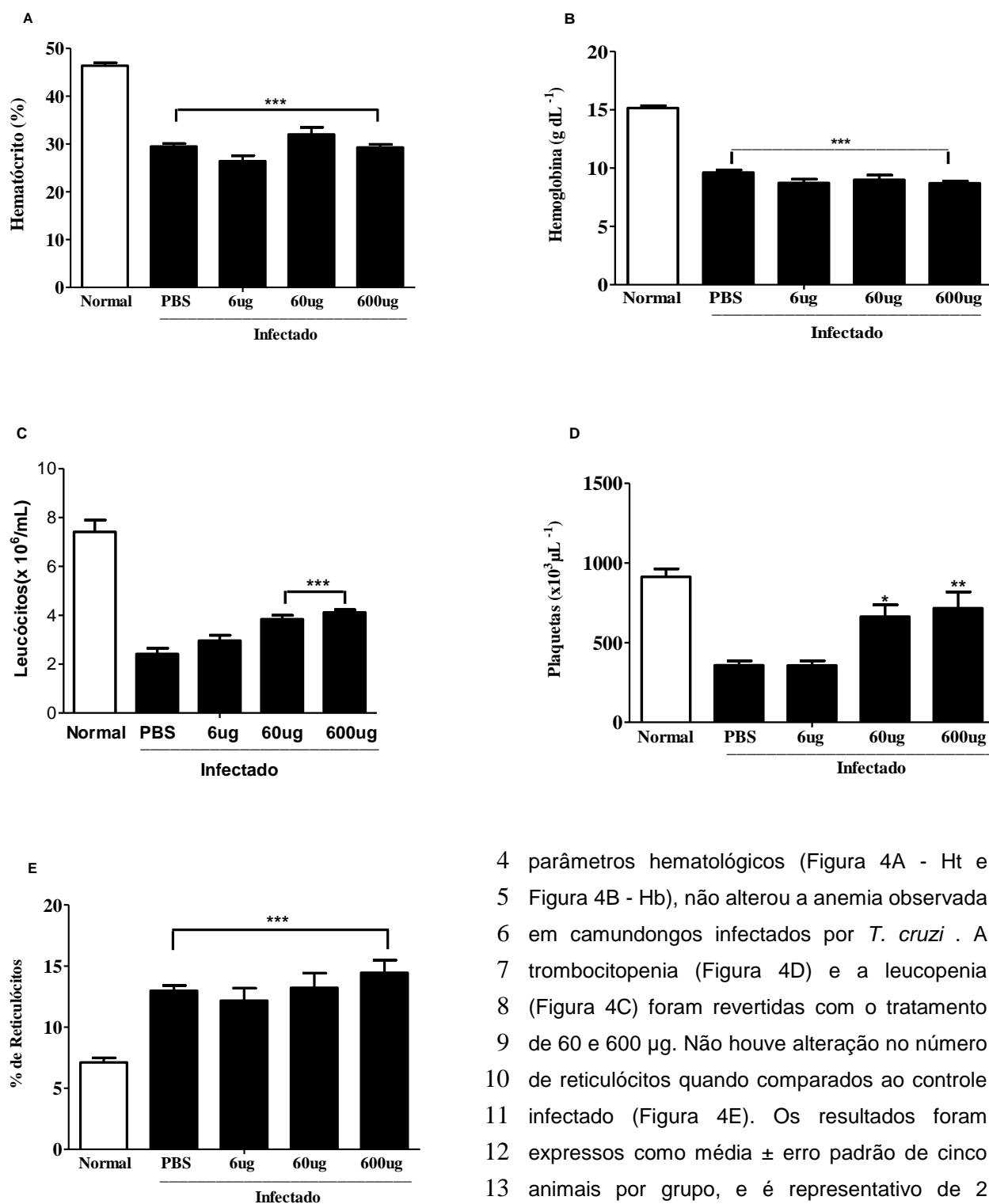
Figura 3. O tratamento de camundongos infectados e tratados com sal de Angeli (60 e 600 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{animal}$, i.p.) provocou uma diminuição significativa na produção de NO plasmático. Os níveis de NO foram avaliados pela mensuração de níveis de nitrito utilizando o sistema cádmio-cobre seguida pelo método de Griess. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de três animais por grupo, e é representativo de 2 experimentos independentes. *,** indica significância ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle.

Análise hematológica

Nossos dados mostram que o tratamento com sal de Angeli não alterou a anemia observada na infecção aguda por *T. cruzi* (Figura 4A e 4B). É conhecido que a infecção em camundongos por *T. cruzi* é caracterizada pelo crescimento exponencial de parasitos e desenvolvimento de anemia, em ambas as espécies de animais resistente e susceptível e é letal em animais susceptíveis como o Swiss e C57BL/6iNOS^{-/-} (MALVEZI et al., 2004; CARDOSO; BRENER, 1980; SAEFTEL et al., 2001). A anemia observada na fase aguda da infecção pode estar relacionada com a produção excessiva de •NO, resultando em danos severos aos tecidos, incluindo destruição de eritrócitos. A infecção por *T. cruzi* pode estar associada com alterações hematológicas significantes tanto no sangue quanto na medula óssea (MARCONDES et al., 2000).

As figuras 4C e 4D mostram que o tratamento com sal de Angeli reverteu a trombocitopenia e diminuiu a leucopenia, respectivamente, observada na fase aguda da infecção. Camundongos experimentalmente infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam além da anemia, trombocitopenia (CARDOSO; BRENER, 1980) e leucopenia (MARCONDES et al., 2000). Esses pesquisadores postularam que a anemia e a trombocitopenia durante a fase aguda da infecção, podem ser consequência da supressão dos precursores mielóides. Em pesquisas anteriores realizadas em nosso laboratório também foi mostrado que a infecção por *T. cruzi* reduz drasticamente o número de plaquetas e os leucócitos no sangue dos animais (MALVEZI et al, 2004; BORGES et al, 2009; TATAKIHARA et al, 2008). A reversão da trombocitopenia a níveis normais e a diminuição da leucopenia observada com o tratamento, pode estar relacionada com a redução dos níveis de NO plasmático observado em nossos experimentos. Já que Malvezi e colaboradores (2004) mostraram que o tratamento com

aminoguanidina, bloqueador da iNOS, foi hábil em melhorar a leucopenia em camundongos Swiss e C57BL/6. Além disso, a produção excessiva de $\bullet\text{NO}$ pode resultar em danos severos aos tecidos (SILVA et al., 1995). Por fim, não foi observada alteração no número de reticulócitos (Figura 4E) quando comparados com controles infectados.



1

2 **Figura 4.** O efeito do tratamento com sal de
3 Angeli (6, 60 e 600 μg/Kg/animal, i.p.) sobre

4 parâmetros hematológicos (Figura 4A - Ht e
5 Figura 4B - Hb), não alterou a anemia observada
6 em camundongos infectados por *T. cruzi*. A
7 trombocitopenia (Figura 4D) e a leucopenia
8 (Figura 4C) foram revertidas com o tratamento
9 de 60 e 600 μg. Não houve alteração no número
10 de reticulócitos quando comparados ao controle
11 infectado (Figura 4E). Os resultados foram
12 expressos como média ± erro padrão de cinco
13 animais por grupo, e é representativo de 2
14 experimentos independentes, **indica
15 significância ($p \leq 0.05$) comparado ao grupo
16 controle infectado.

Estresse oxidativo em eritrócitos

A anemia observada durante a infecção aguda por *T.cruzi* é geralmente acompanhada por lipoperoxidação dos eritrócitos com a participação do NO (MALVEZI et al., 2004) indicando que os radicais livres resultantes do estresse oxidativo provocado tanto pelo parasito, quanto pela resposta imunológica antiparasitária podem ter papel importante na geração da lesão dos eritrócitos.

Os ânions superóxidos produzidos durante a infecção por *T. cruzi* também podem reagir com o NO para formar peroxinitrito (ONOO^-) ou, pela reação de Fenton, podem gerar OH^\bullet , dois radicais altamente reativos que podem estar associados ao dano oxidativo nos eritrócitos observado durante a infecção experimental em camundongos C57BL6 e Swiss (MALVEZI et al.,2004). Estes autores também sugerem que nesse caso, o dano oxidativo no eritrócito pode ser dependente de um balanço entre os níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO^\bullet produzidos pelo hospedeiro.

Avaliação do consumo de oxigênio e tempo de indução (T^{ind})

O consumo de oxigênio pelos eritrócitos está diretamente associado com a susceptibilidade da membrana para sofrer peroxidação lipídica induzido por *t*-BHP (*tert*-butil hidroperóxido) e é proporcional ao estresse oxidativo prévio sofrido pelas hemácias *in vivo* (BORGES et al, 2009; MALVEZI, et al, 2004; TATAKIHARA et al, 2008) . Utilizando eletrodo tipo Clark para medir o consumo de oxigênio em eritrócitos, constatamos um consumo significativamente maior ($p<0,05$) pelos animais infectados por *T. cruzi* quando comparados com os animais não infectados (Figura 5A). O tratamento com sal de Angeli nas concentrações de 60 e 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{animal}$, diminuiu significativamente o consumo de oxigênio.

O tempo de indução (T^{ind}), calculado a partir dos dados do oxímetro, está diretamente relacionado com a capacidade antioxidante intraeritrocitária. Durante a infecção por *T. cruzi* o tempo de indução foi significativamente menor nos camundongos infectados quando comparado ao grupo normal (Figura 5B).

No tratamento dos animais infectados e tratados com sal de Angeli nas concentrações de 60 e 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{animal}$ observou-se um aumento do tempo de indução quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. Corroborando os dados de Consumo de O_2 .

A diminuição do consumo de oxigênio e o aumento do T^{ind} indica que o tratamento com o sal de Angeli acarreta uma melhora do estresse oxidativo sistêmico.

Malvezi e colaboradores (2004), observaram que a infecção por *T. cruzi* levou ao aumento do estresse oxidativo sistêmico, avaliado pelo aumento consumo de oxigênio e diminuição do tempo de indução. Adicionalmente, Tatakihara e colaboradores (2008), verificaram que o tratamento com bloqueadores de COX-1 e COX-2 em animais C57BL/6 infectados por *T. cruzi* apresentaram melhora nos níveis indicadores de estresse oxidativo, os mesmos resultados foram observados por Borges e colaboradores (2009), quando utilizado o NDGA, bloqueador da 5-lipoxigenase.

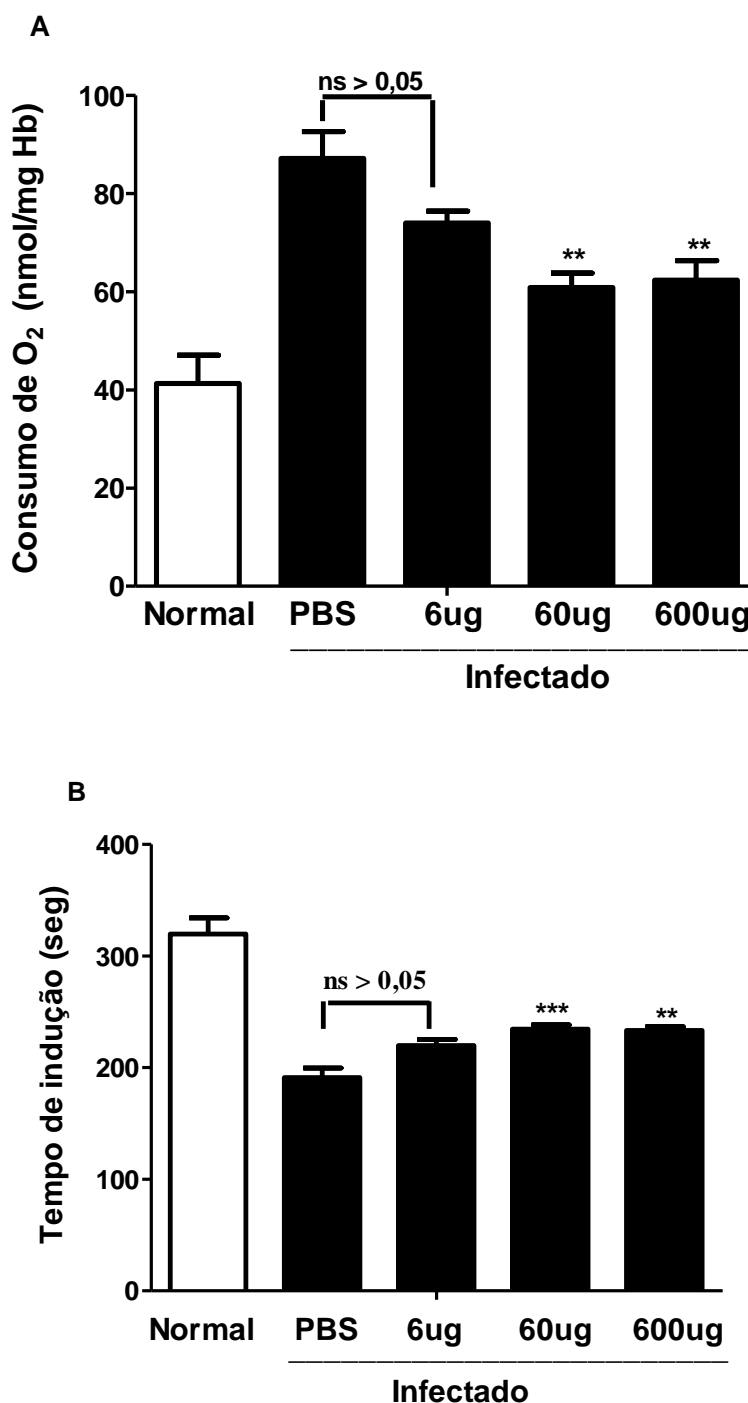


Figura 5. Estresse oxidativo em eritrócitos durante a infecção por *T. cruzi*. Os gráficos mostram o consumo de oxigênio (A) e o tempo de indução T^{ind} (B) induzido pelo t-BHP em eritrócitos de camundongos C57BL/6 normais e infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (12º dia de infecção), tratados ou não com sal de Angeli (6, 60 e 600 μ g) 15 min pós infecção e diariamente durante 12 dias. Os dados representam a média \pm SE e são representativos de dois experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. ** Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo normal.

Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos por quimiluminescência (QL) iniciada por *tert*-butil hidroperóxido

A Figura 6 mostra o perfil das curvas de QL em eritrócitos de camundongos C57BL/6 durante a infecção por *T. cruzi* tratados com sal de Angeli. O grupo tratado com 60 µg de sal de Angeli mostrou menor lipoperoxidação quando comparado ao grupo controle infectado não tratado. Já o tratamento com 6 µg/kg/animal não alterou a lipoperoxidação. Surpreendentemente o tratamento com 600 µg/kg/animal foi semelhante ao controle infectado não tratado. Isso se deve provavelmente a alta sensibilidade da metodologia de quimiluminescência (QL) em detectar lipoperoxidação provocado pela alta concentração de HNO.

A QL induzida por *t*-BHP foi usada para determinar a integridade das defesas não oxidantes e os níveis de lipoperoxidação nos eritrócitos de camundongos infectados por *T. cruzi*. Altos picos de quimiluminescência estão associados a dano oxidativo prévio ao tecido. No caso da lipoperoxidação nos eritrócitos durante a infecção por *T. cruzi*, os picos são elevados e a quimiluminescência é de alta emissão. Este teste baseia-se na suposição de que o aumento da QL é diretamente proporcional ao aumento do estresse oxidativo sofrido pelos eritrócitos, induzindo o consumo das defesas antioxidantes com a formação de lipoperóxidos, resultando num aumento de emissão de fótons (SITOVSKY et al, 1997; CASADO et al, 2007).

Em pesquisas anteriores realizadas em nosso laboratório foi observado que a infecção por *T. cruzi* na fase aguda, provocou aumento de emissão fótons, sugerindo que a infecção leva ao consumo das reservas antioxidantes nos eritrócitos. O tratamento com inibidores de COX-1 e de COX-2 e 5-lipoxigenase em camundongos

C57BL/6, melhorou o estresse oxidativo induzido pela infecção. (BORGES et al, 2009; TATAKIHARA et al, 2008).

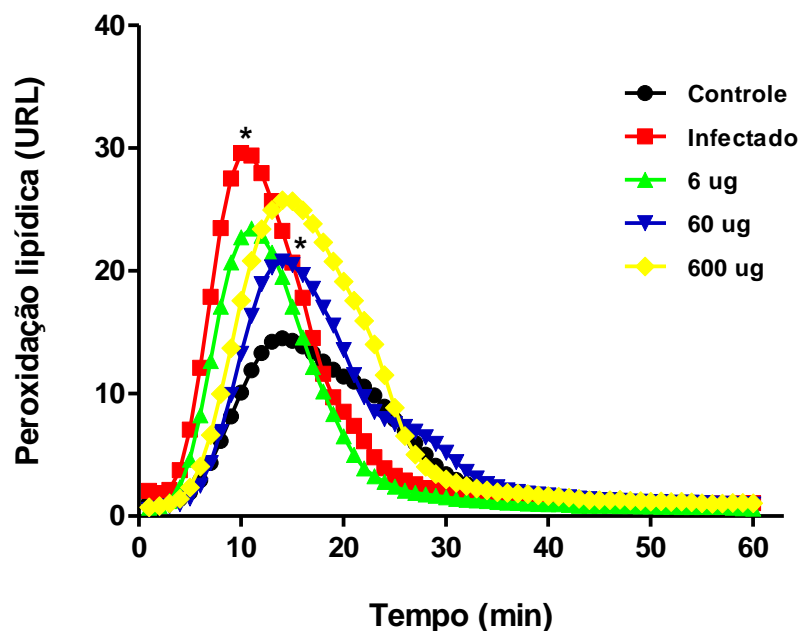


Figura 6. Quimiluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em eritrócitos. Os grupos de camundongos são: grupo controle normal (controle); infectado com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (12 dias pós infecção) e infectado e tratado com sal de Angeli (6, 60 e 600 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{animal}$, i.p.). Os dados representam a média \pm erro padrão de dois experimentos utilizando 5 animais por grupo e foram comparados pelo teste de comparação de Tukey–Kramer e ANOVA. * $p < 0.05$ comparados com grupo infectado.

Índice de internalização de *T. cruzi* em macrófagos

Nossos dados mostram que o tratamento de macrófagos de camundongos C57BL/6 com sal de Angeli na concentração de 30 μ M e 60 μ M provocou uma redução no índice de internalização de *T. cruzi* (Figura 7).

Silva e colaboradores (2010), verificaram que células Vero infectadas por *T. cruzi* e a seguir tratadas com novos complexos de rutênio, apresentaram redução das formas amastigotas, sendo estes compostos capazes de eliminar os parasitos e também levou a redução do número de células infectadas.

Pesquisa em nosso laboratório realizado por Malvezi e colaboradores (2014a), também mostrou a redução dos índices de internalização de *T. cruzi* em macrófagos de camundongos BALB/C tratados com ASA. Além disso, foi mostrado que o tratamento de células cardíacas com inibidores de COX-1 e COX-2 provocou uma redução nos índices de internalização de *T. cruzi* (MALVEZI et al 2014b).

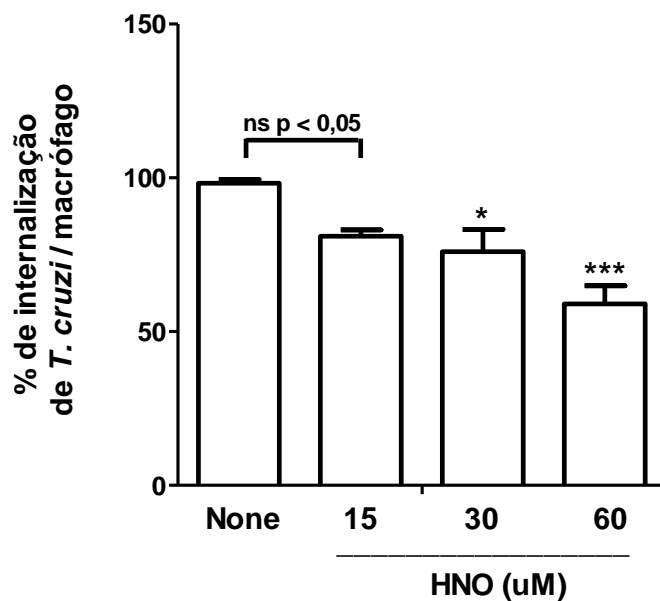


Figura 7. Índice de internalização. 2×10^5 macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com 1 mL de tioglicolato 5%, foram semeados em placa de cultura de 24 poços contendo lamínulas redondas. As culturas em triplicatas foram mantidas por 24 h a 37°C em CO_2 para adesão das células. Em seguida as culturas foram lavadas exaustivamente com PBS morno para remoção das células não aderentes. Logo em seguida, as culturas foram tratadas com sal de Angeli nas concentrações de $15 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ e $60 \mu\text{M}$ e mantidas por 1 hora a 37°C em atmosfera rica em CO_2 . A seguir, as culturas eram lavadas por 3 vezes com PBS morno e incubadas na presença de 1×10^6 formas tripomastigotas de cultura celular de *T. cruzi* (cepa Y, razão 5:1). 2 horas depois, as culturas de macrófagos foram submetidas ao processo de lavagem com PBS morno (3x). Depois das lavagens, as lamínulas eram cuidadosamente removidas, colocadas para secar. Após a secagem, as lamínulas foram coradas pelo método de Bouin/Giemsa, montadas com Permount (Fisher Scientific) e analisadas por microscopia óptica (microcópico Olympus, aumento final de 1000x). O índice de internalização foi calculado com base na contagem de 500 células/lamínula segundo a fórmula: $(\text{número de células infectadas}/\text{número total de células}) \times (\text{número total de } T. cruzi/\text{número de células infectadas})$.

Efeito do tratamento diário com sal de Angeli's na liberação de formas tripomastigotas no meio de cultura

O tratamento com sal de Angeli nas concentrações de 30 e 60 μM provocou uma redução significativa na liberação das formas tripomastigotas. E esta liberação foi dose dependente. Já o tratamento com 15 μM foi insuficiente para provocar uma redução na liberação. Essa redução já tinha sido observada por outros pesquisadores ao utilizarem inibidores de COX *in vitro* (MICHELIN, 2005; ABDALLA et al, 2008). Recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento diário de macrófagos com ASA, diminuiu a liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) no meio de cultura (MALVEZI et al, 2014)^a.

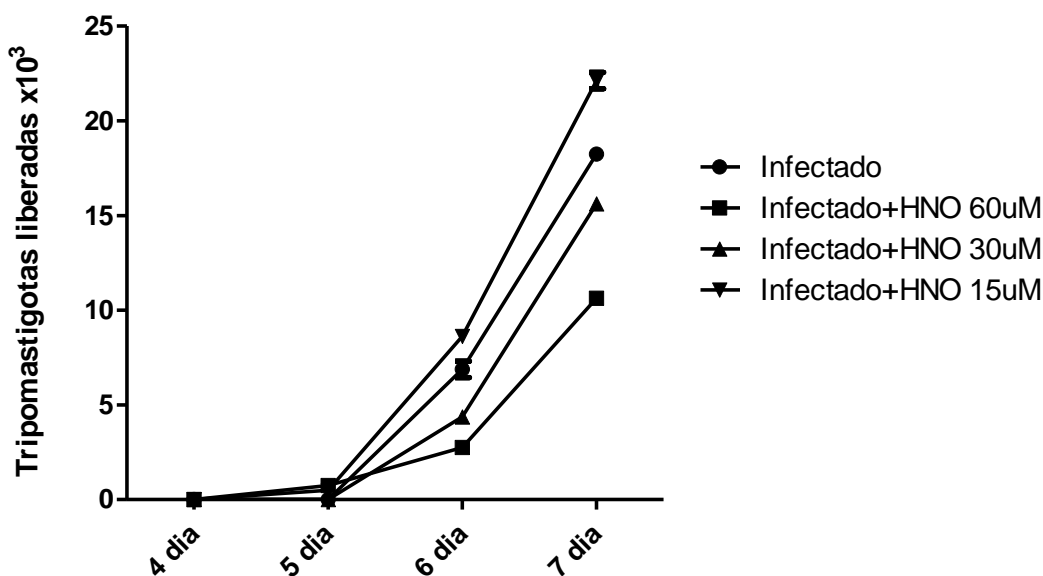


Figura 8. Efeito do sal de Angeli sobre a liberação de *T. cruzi* de macrófagos infectados. As células foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tratadas diariamente com sal de Angeli nas concentrações de 15, 30 e 60 μM ; após 4 dias de tratamento, as formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante foram contadas até o dia 7 pós infecção. Os resultados são a média \pm erro padrão para determinações em triplicata e são representativos de dois experimentos independentes.

O tratamento com sal de Angeli reduziu os níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos

O tratamento de macrófagos de camundongos C57BL/6 com sal de Angeli's nas concentrações de 15, 30 e 60 μM , foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-10 no sobrenadante de cultura após 24 h de infecção por *T. cruzi* em relação ao controle infectado. Porém, na concentração de 15 μM foi observado uma produção significativamente maior em relação as concentrações de 30 e 60 μM . No entanto, Zarpelon e colaboradores (2013), relataram que HNO provocou uma redução nos níveis de IL-1 β e TNF- α após indução com carragenina em ratos Wistar.

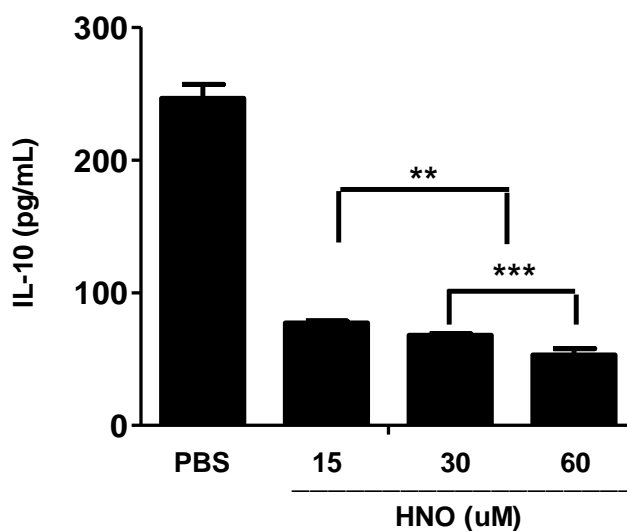


Figura 9. Produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de macrófagos. 2×10^5 macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com 1 mL de tioglicolato 5%, foram semeados em placa de cultura de 48 poços. As culturas em triplicatas foram mantidas por 24 h a 37°C em CO_2 para adesão das células. Em seguida as culturas foram lavadas exaustivamente com PBS morno para remoção das células não aderentes. Logo em seguida, as culturas foram tratadas sal de Angeli nas concentrações de 15 μM , 30 μM e 60 μM e mantidas por 1 hora a 37°C em atmosfera rica em CO_2 . A seguir, as culturas eram lavadas por 3 vezes com PBS morno e incubadas na presença de 1×10^6 formas tripomastigotas de cultura celular de *T. cruzi* (cepa Y, razão 5:1). 2 horas depois, as culturas de macrófagos foram submetidas ao processo de lavagem com PBS morno (3x) para retirada dos parasitos. E incubados 24h para coleta do sobrenadante para análise. Os resultados são a média \pm erro padrão para determinações em triplicata e são representativos de dois experimentos independentes.

Conclusões

- 1) O tratamento de camundongos C57BL/6 'in vivo' com sal de Angeli (doador de HNO) na concentração de 60 µg reduziu significativamente a parasitemia e o número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco;
- 2) Houve uma redução na produção de NO tanto 'in vivo' quanto 'in vitro' nos tratamentos com sal de Angeli. Isso provavelmente devido a regulação negativa da enzima iNOS;
- 3) O tratamento com sal de Angeli não foi capaz de reverter a anemia observada durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Contudo melhorou a leucopenia e a trombocitopenia provocada pela infecção;
- 4) Os níveis de peroxidação das membranas dos eritrócitos foram reduzidos com o tratamento por sal de Angeli, observado pela redução do consumo de oxigênio e pelo aumento do tempo de indução (T^{ind}). Também foi observado uma diminuição na emissão de fótons na QL na concentração de 60 µg;
- 5) O tratamento com sal de Angeli também provocou uma diminuição no índice de internalização de *T. cruzi* em macrófagos e foi capaz de diminuir a saída de formas tripomastigotas no meio de cultura, juntamente com a redução nos níveis de IL-10 nas concentrações de 30 e 60 µM. Surpreendentemente na concentração de 15 µM houve uma diminuição de IL-10 sem, contudo reduzir a entrada e saída de formas tripomastigotas.

Referências

- ABDALLA, G.K., FARIA, G.E.L., SILVA, K.T., CASTRO, E.C.C., REIS, M.A., MICHELIN, M.A. Trypanosoma cruzi: the role of PGE₂ in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.* 118: 514-521, 2008.
- ANDRADE, Z.A. Patologia da Doença de Chagas. *In*: BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 200-230, 2000.
- ANNING, B.P., COLES, B.; MORTON, J.; WANG, H.; UDDIN, J.; MORROW, D.J.; DEY, K.S.; MARNETT, J.; et al. Nitric oxide deficiency promotes vascular side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Blood.* 108,4059-4062, 2006.
- BAIN, B.J. Células Sanguíneas: Um guia prático, 2º Ed., Porto Alegre, Artes Médicas, 1997.
- BAINY, A.C.D., SAITO, E., CARVALHO, P.S.M., JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*: 34, 151-162, 1996.
- 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. *Immunology Letters.* 123: 38-45, 2009.
- BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4: 389–396, 1962.
- BURLEIGH, B.A., ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Rev. Microbiol.* 49: 175, 1995.
- BUTLER, A.R.; WILLIAMS, D.L.H. The physiological role of nitric oxide. *Chem. Soc. Rev.* 22,233-241, 1993.
- CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 75: 97-104, 1980.
- CASADO, M.F., CECCHINI, A.L., SIMÃO, A.N.C., OLIVEIRA, R.D., CECCHINI, R. Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. *Food and Chemical Toxicology.* 45: 945–952, 2007.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., s.sp. agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. American Trypanosomiasis: Epidemiology & Risk Factors. 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>> Acesso em 04 dez. 2013.

COLASANTI, M.T., PERSICHINI, M., MENEGAZZI, S., MARIOTTO, E., GIORDANO, C.M., CALDARERA, V., SOGOS, G.M., LAURO, and H. SUZUKI. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression: suppression by exogenous nitric oxide. *J. Biol.Ch em.* 270:26731. 1995.

CONNELLY, L., PALACIOS-CALLENDER, M., AMEIXA, C., MONCADA, S., HOBBS, A.J. Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J. Immunol.* 166: 3873-3881, 2001.

DAI, T., TIAN, Y., TOCHETTI, G., KATOR, T., MURPHY, A.M., KASS, D.A., PAOLOCCI, N., GAO, W.D. Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *J. Physiol.* 580, 951-960, 2007.

DeMASTER, E.G., REDFERN, B., NAGASAWA, H.T. Mechanisms of inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitroxyl, the active metabolite of alcohol deterrent agent cyanamide. *Biochem Pharmacol.* 55:2007-2015, 1998.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Ann. Rev. Microbiol.* 46: 695-729, 1992.

FEELISH, M. Nitroxyl gets to the heart of the matter. *Proc Natl Acad SCI USA.* 100, 4978-4980, 2003.

FROELICH, J.P., MAHANEY, J.E., KECELI, G., PAVLOS, C.M., GOLDSTEIN, R., REDWOOD, A.J., SUMBILLA, C., LEE D.I., TOCCHETTI, C.G., KASS, D.A., PAOLOCCI, N., TOSCANO, J.P. Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl . *Biochemistry*, 47, 13150-13152, 2008.

FUKUTO, J.M.; CARRINGTON, J. HNO signaling mechanisms. *Antioxidants & Redox Sinaling.* 14:9, 2011.

IRVINE, J.D.; RITCHIE, D.H.; FAVALORA, J.L.; ANDREWS, K.L.; et al. Nitroxyl (HNO): the cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol. Sci.* 29: 601-608, 2008.

KEMP-HARPER, B.K. Nitroxyl (HNO): A novel redox signaling molecule. *Antioxidants & Redox Signaling.* 14 (9): 1609-1613, 2011.

KIERSZENBAUM, F. et al. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 112, 1839–1844, 1974.

LISSI, E.R., FRANSJ. C., FERNANDES, V., VIDELA, L.A. Effects of antioxidants and haemoglobin status on the *t*-butyl hydeoperoxide induced oxygen uptake by red blood cells. *Cell Biochem. Funct*, 4: 447- 454, 1986.

MARCONDES, M. C. G.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect.*, 2: 347-352, 2000.

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

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

MALVEZI, A.D., PANIS, C., SILVA, R.V., FREITAS, R. C., LOVO-MARTINS, M. I., TATAKIHARA, V. L. H., 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, 2014^b.

MARAGOS, C.M., MORLEY, D., WINK, D.A., DUNAMS, T.M., SAAVEDRA, J.E., HOFFMA, A., BOVE, A.A., ISAAC, L., HRABIE, J.A., KEEFER, L.K. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J. Med. Chem.*, 34, 3242-3247, 1991. MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol. Infect.* 136(9):1153-64. 2008.

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

MÜLLER, S., LIEBAU, E., WALTER, R.D., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 19: 320-8, 2003.

PAGLIARO, P., MANCARDI, D., RASTALDO, R., PENNA, C., GATTULLO, D., MIRANDA, K.M., FEELISCH, M., WINK, D.A., KASS, D.A., PAOLOCCI, N. Nitroxyl affords thiol-sensitive myocardial protective effects akin to early preconditioning. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 33-43, 2003.

PANIS, C., MAZZUCO, T.L., COSTA, C.Z.F., VICTORINO, V.J., TATAKIHARA, V.L.H., YAMAUCHI, L.M., YAMADA-OGATA, 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. *Experimental Parasitology*, 2010.

PAOLOCCI, N.; KATORI, T.; CHAMPION, H.C.; ST. JOHN, M.E.; et al. Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: independence from β -adrenergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100,5537-5542, 2003.

PAVANELLI, W.R., SILVA, J.J.N., PANIS, C., CUNHA, T.M., COSTA, I.C., MENEZES, M.C.N.D., OLIVEIRA, F.J.A., LOPES, L.G.F., CECCHINI, R., CUNHA, F.Q., WATANABE, M.A.E., ITANO, E.N. Experimental chemotherapy in Paracoccidioidomycosis using Ruthenium NO donor. *Mycopathologia*, 172, 95-107, 2011.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North. Am.* (2):275-91, 2012.

ROGGERO, E., PÉREZ, A.R., TAMAE-KAKAZU, M., PIAZZON, I., NEPOMNASCHY, I., BESEDOVSKY, H.O., BOTTASSO, O.A., DEL REY, A., Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection *Journal of Endocrinology* 190, 495-503, 2006.

SAEFTTEL, M., FLEISCHER, B. and HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 69, 2252–2259, 2001.

SILVA JS, VESPA GNR, CARDOSO MAG, et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.*, 63:4862– 4867, 1995.

SILVA LHP; NUSSENZWEIG V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clin Biol* 20: 191–207, 1953.

SILVA, J.J.N., OSAKABE, A.L., PAVANELLI, W.R., SILVA, J.S., FRANCO, D.W. In Vitro and in Vivo Antiproliferative and Trypanocidal Activities of Ruthenium NO Donors. *Br. J. Pharmacol.* V.152. p.112–121, 2007.

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

SILVA, J.J.N., GUEDES, P.M.M., ZOTTIS, A., BALLIANO, T.L., SILVA, F.O.N., LOPES, L.G.F., ELLENA, J., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A.D., FRANCO, D.W., SILVA, J.S. Novel ruthenium complexes as potencial drugs for Chaga's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. *Brit. J. Pharmacol.* 160, 260-269, 2010.

SITOVZHEVSKY, A.V., HAVALKIN, I.V., IVANOV, V.V., KONDAKOVA, I.V. Kinetics of tert-Butyl hydroperoxide decomposition in erythrocyte suspension. *Membr. Cell. Biol.* 11: 487-495, 1997.

SMITH, P.A.S., HEIN, G.E. The alleged role of nitroxyl in certain reactions of aldehydes and alkylhalides. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 5731-5746, 1960.

STEINER, M.; VANCURA, S. Asymmetrical loss of sialic acid from membrane glycoprotein during platelet aging. *Thromb. Res.*, 40: 465-471; 1985.

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.

TRIBULATTI, M.V., MUCCI, J., VAN ROOIJEN, N., LEGUIZAMÓN, M.S., CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic Acid contents. *Infect. Immunol.*, 73: 201-207, 2005.

TOGASHI, H.M., SASAKI, E., FROHMAN, E., TAIRA, R.R., RATAN, T.M., DAWSON, V.L. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2676, 1997.

UMANSKY, V., HEHNER, S.P., DUMONT, A., HOFMANN, T.G., SCHIMMACHER, V., DROGE, W., SCHMITZ, M.L. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- κ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur. J. Immunol.* 28: 2276–2282, 1998.

VELÁZQUEZ, C.A.; CHEN, Q.H.; CITRO, M.L.; KEEFER, L.K.; KNAUS, E.E. Second-generation aspirin and indomethacin prodrugs possessing an O⁻² (acetoxymethyl)-1-(2-carboxypyrrolidin-1-yl)diazonium-1,2-diolate nitric oxide donor moiety: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies. *J. Med. Chem.* 51, 1954-1961, 2008.

VIEIRA, M. et al. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.* 118, 491–500, 2002.

WILKINSON, S.R., TEMPERTON, N.J., MONDRAGON, A., KELLY, J.M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 275, 8220-8225, 2000.

WHO, World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em 04 dez. 2013.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 155: 3955-3963, 1995.

ABRAHAMSOHN, I. A.; Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31: 177-121, 1998.

ANDRADE, S.G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J.B.; FERRIOLLI FILHO, F.; LUQUETTI, A.O. Specific chemotherapy of Chagas Disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 86: 624-626. 1992.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Patologia. In *T. cruzi* e Doença de Chagas (Brenner, Z.; Andrade, Z.A., eds), pp. 199-248, **Editores Guanabara Koogan S.A.**, Rio de Janeiro, 1979.

ANDREI, D.; SALMON, D.J.; DONZELLI, S.; WAHAB, A.; KLOSE, J.R.; CITRO, M.L.; SAAVEDRA, E.; WINK, D.A.; MIRANDA, K.M.; KEEFER, L.K. Dual Mechanisms of HNO Generation by a Nitroxyl Prodrug of the Diazeniumdiolate (NONOate) Class. **J. Am. Chem. Soc.** 132, 16526-16532, 2010.

ANDREWS, N. W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.** 26: 65-67, 1995.

ANNING, B.P., COLES, B.; MORTON, J.; WANG, H.; UDDIN, J.; MORROW, D.J.; DEY, K.S.; MARNETT, J.; et al. Nitric oxide deficiency promotes vascular side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Blood.** 108, 4059-4062, 2006.

BAIN, B.J. **Células Sanguíneas: Um guia prático**, 2^o Ed., Porto Alegre, Artes Médicas, 1997.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**: 34, 151-162, 1996.

BARTBERGER MD, LIU W, FORD E, MIRANDA K, SWITZER CH, AND FUKUTO JM. The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 10958–10963, 2002.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochemical and biophysical research communications.** 315(3):710-8, 2004.

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

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion for cure in mice experimentally infected with *T. cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 4:389-396, 1962.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Microbiol.** 27: 347-382, 1973.

BULLEN, M.L.; MILLER, A.A.; ANDREWS, K.L.; IRVINE, J.C.; RITCHIE, R. H.; SOBEY, C.G.; KEMP-HARPER, B.K. Nitroxyl (HNO) as a vasoprotective signaling molecule. **Antioxid Redox Signal** 14(9), 1675-1687, 2011.

BURGAUD, J.L.; RIFFAUD, J.P.; DEL SOLDATO, P. Nitric-oxide releasing molecules: a new class of drugs with several major indications. **Current Pharma Design.** 8:201-2013, 2002.

BURLEIGH, B. A; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Rev. Microbiol.** 49: 175, 1995.

BUTLER, A.R.; WILLIAMS, D.L.H. The physiological role of nitric oxide. **Chem. Soc. Rev.** 22,233-241, 1993.

CABEZA-MECKERT, P.; LAGUENS, R. Modelos experimentais. In: **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Doyma, cap. 9,129-140, 1994.

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

CARDONI, R. L.; ANTÚNEZ, M. I. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Med of inflam.** 13(4): 235-240, 2004.

CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 75: 97-104, 1980.

CARINI, M., ALDINI, G., ORIOLI, M., PICCOLI, A., ROSSONI, G., FACINO, R. M. Nitric oxide release and distribution of nitroaspirin (NCX 4016) in the rat. **Life Sci.** 74: 3291-3305, 2004.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **American Trypanosomiasis: Epidemiology & Risk Factors.** 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html> Acesso em 04 dez. 2013.

CECCHINI, R. **Depressão da atividade do sistema metabolizador de drogas microssomal hepático, dependente do citocromo P450, no decurso da infecção aguda de camundongos pelo *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* cepa CL.** 1987. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. Anti-*T. cruzi* agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. **Mini Rev. Med. Chem.** 8: 1355-1383, 2008.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., s.sp. agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.

COSTA, F., FRANCHIN, G., PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L., RIBEIRÃO, M., SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**, 16:768-774, 1998.

COURA, J.R., CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 97: 3-24, 2002.

DACIE, J.U.; LEWIS, S.M., **Hematologia Prática**, Ediciones Toray, S. A. Barcelona, 1975.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Inter Rev of Cyt**, 86: 197-283, 1984.

DIAS, J.C.P. História natural da doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.**, 65:359-66, 1995.

DO CARMO, E. M. **Lipoperoxidação, enzimas antioxidantes de eritrócito, fígado e coração e potencial antioxidante plasmático de camundongos infectados pelo *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas , 1909) Cepa CL. 1995** Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina.

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

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

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Rev. Microbiol.** 46: 695-729, 1992.

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

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and γ -radiolysis in oxyradical research. In: VIGO-PELFREY C. **Membr Lipid oxid** 1ed Santa Clara, CRC press. 2-30, 1991.

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

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

GILBERT, H. F.; MC LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-dissulfide exchange. **Adv. Enzymol Relat Areas Mol. Biol.** 63: 69-172, 1990.

GIRONES, N. ; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trend.Parasitol.** 19(1): 19-22, 2003.

GOW, A. J.; LUCHSINGER, B. P.; PAWLOSKI, J. R.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 96: 9027–9032, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B. Free radicals in biology and Medicine. 2 ed New York: Oxford University Press, cap. 4, 189-276, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4th edition., New York: Oxford University, 2007.

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

HOFF, R. Killing *in vitro* *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG and absence of cross-immunity and challenge *in vivo*. **J. Exp. Med.** 142: 299-311, 1975.

HOLLEY, A. E.; CHEESEMAN, K. H. Mensuração das reações dos radicais livres *in vivo*. In: Olszewer, R. **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: Interlivros Edições, 15-26, 1996.

IRVINE, J.D.; RITCHIE, D.H.; FAVALORA, J.L.; ANDREWS, K.L.; et al. Nitroxyl (HNO): the cinderella of the nitric oxide story. **Trends Pharmacol. Sci.** 29: 601-608, 2008.

KEMP-HARPER, B.K. Nitroxyl (HNO): A novel redox signaling molecule. **Antioxidants & Redox Signaling.** 14 (9): 1609-1613, 2011.

KIERSZENBAUM, F.; LIMA, M. F.; WIRTH, J. J. Effects of antiserum to *Trypanosoma cruzi* on the uptake and rate of killing of vector-borne, metacyclic forms of the parasite by macrophages. **Int J Parasitol.** 15(4):409-13, 1985.

KÖEBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis. **Adv. Parasit.**, 6: 63-113, 1968.

LISSI, E. R.; FRANSJ. C.; FERNANDES, V.; VIDELA, L. A. Effects of antioxidants and haemoglobin status on the *t*-butyl hydroperoxide induced oxygen uptake by red blood cells. **Cell Biochem. Funct.** 4: 447- 454, 1986.

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

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

MARAGOS, C.M.; MORLEY, D.; WINK, D.A.; DUNAMS, T.M.; SAAVEDRA, J.E.; HOFFMAN, A.; BOVE, A.A.; ISAAC, L.; HRABIE, J.A.; KEEFER, L.K. Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. **J Med Chem.** 34(11):3242-7. 1991.

MARCONDES, M. C. G.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes Infect.**, 2: 347-352, 2000.

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

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

MCCABE, R. E.; MULLINS, B. T. Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune and importance of oxygen-independent killing. **J. Immunol.** 144: 2384-2388, 1990.

MIRANDA, K.M.; KATORI, T.; TORRES, D.E.; HOLDING, C.L.; THOMAS, L.; RIDNOUR, L.A.; MCLENDON, W.J.; COLOGNA, S.M.; DUTTON, A.S.; CHAMPION, H.C.; MANCARDI, D.; TOCCHETTI, C.G.; SAAVEDRA, J.E.; KEEFER, L.K.; HOUK, K.N.; FUKUTO, J.M.; KASS, D.A.; PAOLOCCI, N.; WINK, D.A. Comparison of the NO and HNO donating properties of diazeniumdiolates: primary amine adducts release HNO in Vivo. **J Med Chem.** 29;48(26):8220-8. 2005b.

MIRANDA, K.M.; NAGASAWA, H.T.; TOSCANO, J.P. Donors of HNO. **Curr Top Med Chem.** 5(7):649-64. 2005a.

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43: 109–140, 1991.

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

NAPOLI, C, IGNARRO, L.J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Rev Pharmacol Toxicol**. 43:97–123, 2003.

NATHAN, C. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** 149: 1056-1068, 1979.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. A. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* induction of macrophage microbicidal activity. **J. Exp. Med.** 148:288-300, 1978.

PAGLIARO, P.; et al. Nitroxyl affords thiol-sensitive myocardial protective effects akin to early preconditioning. **Free Radic. Biol. Med.** 34,33-43, 2003.

PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z. F.; VICTORINO, V. J.; TATAKIHARA, V. L. H.; 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**. 127:58-65, 2010.

PAOLOCCI, N.; KATORI, T.; CHAMPION, H.C.; ST. JOHN, M.E.; et al. Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: independence from β -adrenergic signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100,5537-5542, 2003.

PAWLOSKI, J. R., HESS, D. T., STAMLER, J. S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. **Nature** 409: 622-626, 2001

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

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins-mediated suppression of lymphoproliferation and cytokine synthesis during the early phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell. Immunol.**, 193:90-98, 1999.

PINTO DIAS, J. C. Epidemiologia. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, N. *Tripanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: **Editores Guanabara, Koogan, S. A.** 2000.

RAO, C.V.; REDDY, B.S.; STEELE, V.E. Nitric oxide-releasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxymethane-treated rats: effects on molecular targets. **Mol. Cancer Ther.** 5:1530-1538, 2006.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (chagas disease). **Infect. Dis. Clin. North. Am.** (2):275-91, 2012.

RASSI-JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet.** v.375. 1388-1402, 2010.

RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. **Biochem. J.**, 244: 191-196, 1987.

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

ROODMANN, G. D.; BIRD, A.; HUTZLER, D.; MONTGOMERY, W. Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of eritroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60 and HEL cells. **Exp. Hematol.**, 15: 928, 1987.

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

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

SILVA, S. S.; VESPA, G. N. R.; CARDOSO, M. A.G.; ALIBERTI, J. C. S.; CUNHA F.Q. Tumor necrosis factor alfa mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, 12: 4862-4867, 1995.

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

SMITH W.L., LANGENBACH R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J. Clin. Invest.** 107:1491-1497, 2001.

STEINER, M.; VANCURA, S. Asymmetrical loss of sialic acid from membrane glycoprotein during platelet aging. **Thromb. Res.**, 40: 465-471; 1985.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends parasitol.**, 19(10):447-51, 2003.

TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-12 production. 1. Evidence for the presence of IL-12 producing cells. **J. Immunol.** 140: 2763-2768, 1988.

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.

TRIBULATTI, M. V.; MUCCI, J.; VAN ROOIJEN, N.; LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic Acid contents. **Infect. Immunol.**, 73: 201-207, 2005.

TRUYENS C, ANGELO BARROS A, TORRICO F, VAN DAMME J, HEREMANS H, CARLIER Y: Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. **Infect. Immun.** 62:692-696, 1994.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **J. Parasitol.**, 31: 472-481, 2001.

VELÁZQUEZ, C.A.; CHEN, Q.H.; CITRO, M.L.; KEEFER, L.K.; KNAUS, E.E. Second-generation aspirin and indomethacin prodrugs possessing an O⁻² (acetoxymethyl)-1-(2-carboxypyrrolidin-1-yl)diazonium-1,2-diolate nitric oxide donor moiety: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies. **J. Med. Chem.** 51,1954-1961, 2008.

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

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

WALLACE, J. F.; ELLIOTT, S. N.; DEL SOLDATO, P. Gastrointestinal-sparing anti-inflammatory drugs: The development of nitric oxide-releasing NSAIDs. **Drug Dev Res** 42:144-149, 1997.

WEN, J-J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. **Free Radic. Biol. Med.** 37(11): 1821-1833, 2004.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis). 2013.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em 04 dez. 2013.

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

ZACKS, M. A.; WEN, J-J.; VYATKYNA, G.; BHATIA, V.; GARG, N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **An Acad. Bras. Cienc.** 77(4): 695-715, 2005.

ZARPELON, A. C.; SOUZA, G. R.; CUNHA, T. M. SCHIVO, R. S.; MARCHESI, M.; CASAGRANDE, R.; PINGE-FILHO, P.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H.; MIRANDA, K. M.; VERRI JR, W. A. The nitroxyl donor, Angeli's salt, inhibits inflammatory hyperalgesia in rats. *Neuropharmacology*, 71: 1-9, 2013.