



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CELSO LUIZ BORGES

**“PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE NO CONTROLE DA CARGA
PARASITÁRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO DE
ERITRÓCITOS DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL COM *TRYPANOSOMA CRUZI*”**

Londrina
2007

CELSO LUIZ BORGES

**“PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE NO CONTROLE DA CARGA
PARASITÁRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO DE
ERITRÓCITOS DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL COM *TRYPANOSOMA CRUZI*”**

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

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

Londrina
2007

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B732p Borges, Celso Luiz.
Papel da 5-Lipoxigenase no controle da carga parasitária e no estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi* / Celso Luiz Borges. – Londrina, 2007.
139f. : il.

Orientador : Phileo Pingé Filho.
Dissertação (Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2007.
Bibliografia : 80-94; 132-139.

1. Patologia experimental – Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* – Teses.
3. Chagas, Doença de – Teses. 3. Óxido nítrico – Teses 4. Eritrócitos – Teses. I. Pingé Filho, Phileo. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 616.937.3

CELSO LUIZ BORGES

**“PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE NO CONTROLE DA CARGA
PARASITÁRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO DE
ERITRÓCITOS DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL COM *TRYPANOSOMA CRUZI*”**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci Bastos

Prof. Dr. Rubens Cecchini

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho

Londrina, 26 de fevereiro de 2007.

Apoio Finaceiro

CAPES

FAEP/UEL

CNPq (processo 478239\01-7)

Aos meus pais Osmário e Deny o meu eterno reconhecimento e gratidão por colocarem em meu caminho a luz mais brilhante que puderam encontrar: O Estudo.

À minha esposa Cíntia Regina, pelo amor, confiança, compreensão, incentivo e cumplicidade para trilhar novos caminhos em busca de um ideal.

A todos os meus familiares, meu muito obrigado pelo amor, apoio e dedicação constantes.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Orientador Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, serei sempre grato por me mostrar que ensinar é acreditar que se pode contribuir para a formação de um caráter; é compartilhar de sua própria existência.

“O professor se liga à eternidade; ele nunca sabe onde cessa sua influência”.

Henry Adams

- Minha eterna gratidão ao Prof. Dr. Rubens Cecchini por sua brilhante condução ao caminho do descobrimento e da sabedoria.

- À Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada-Ogatta e aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, agradeço a dedicação, o tempo e a experiência desprendida para que minha formação fosse também um aprendizado.

- Muito obrigado aos meus amigos: Vera Lucia H. Tatakihara, Aparecida Donizette Malvezi, Talita Perdigão Domiciano, Juliane Alves, Andréia A. Suzukawa, Jesus Antonio Vargas, Paulo Correa, Viviane K. Graça de Souza e Ana Flavia Specian pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho.

- Agradeço aos meus colegas do Mestrado, aos funcionários do Centro de Ciências Biológicas, aos meus amigos do Laboratório Clinipon de Ponta Grossa que na humildade do anonimato me apoiaram na realização deste trabalho.

“Não acredite. Experimente!”
Cicerone dos Santos Brugnago

BORGES, Celso Luiz. **Papel da 5-lipoxigenase no controle da carga parasitária e no estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental com *trypanosoma cruzi***. 2007. 137f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Recentemente foi mostrado que o óxido nítrico (NO) produzido durante a infecção com *Trypanosoma cruzi* participa do estresse oxidativo em eritrócitos, mas não é necessário para o desenvolvimento da anemia na fase aguda da infecção em camundongos. Neste trabalho foi investigado o efeito da inibição da produção de leucotrienos (LTs) através do bloqueio farmacológico ou genético da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Foram utilizados camundongos C56BL/6, C57BL/6 iNOS KO, 129 WT sv e 129 5-LO^{-/-} infectados ou não com *T. cruzi* (Cepa Y). Foram avaliados os seguintes parâmetros: anemia, carga parasitária e estresse oxidativo em eritrócitos durante a fase inicial da infecção com *T. cruzi*. O estresse oxidativo em eritrócitos obtidos de camundongos infectados, tratados ou não com NDGA e camundongos 5-LO^{-/-} foi investigado através da determinação do perfil de oxidação da hemoglobina, consumo de oxigênio, tempo de indução (T^{ind}) e quimiluminescência iniciada com *tert*-butil hidroperóxido (t-BHP). Nossos dados sugerem que os LTs não participam do desenvolvimento da anemia durante a fase aguda da infecção com o *T. cruzi*. Nós mostramos que o tratamento dos camundongos infectados com NDGA atenuou o estresse oxidativo em eritrócitos que se desenvolve na fase aguda da infecção. Os camundongos nocautes para 5-LO também apresentaram menor estresse oxidativo em relação aos controles. O tratamento com NDGA e a falta do gene para 5-LO aumentou significativamente a carga parasitária no sangue e no tecido cardíaco (12º dia após infecção) em comparação com os camundongos infectados não tratados ou com o gene para 5-LO íntegro. A produção de NO por macrófagos ativados foi diminuída tanto em camundongos tratados com NDGA quanto naqueles onde a 5-LO está ausente. Nossos dados indicam pela primeira vez que os LTs exercem papel essencial no controle da carga parasitária no sangue e no coração, no desenvolvimento do estresse oxidativo sistêmico, bem como na regulação da produção de NO por macrófagos ativados durante a fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi*.

Palavras-chave: Patologia experimental. *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Óxido nítrico Eritrócitos.

BORGES, Celso Luiz. **Papel da 5-lipoxigenase no controle da carga parasitária e no estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental com *trypanosoma cruzi***. 2007. 137f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Recently, it was demonstrated that nitric oxide (NO) produced during *Trypanosoma cruzi* infection participates of erythrocyte oxidative stress, but is not necessary for the development of anemia in the acute phase of infection in mice. In this work it was investigated the effect of inhibition of leukotrienes (LTs) by pharmacological or genetic blocking of the 5-lipoxygenase (5-LO) enzyme. We used C56BL/6, C57BL/6 iNOS KO, 129sv (WT) and 129 5-LO^{-/-} *T. cruzi*-infected-treated or not with nordihydroguaiaretic acid (NDGA). We assessed assays to analyze anemia, the control of parasite burden, erythrocyte oxidative stress during an acute phase of *T. cruzi* infection. The oxidative stress in erythrocyte from mice infected-NDGA-treated or not and 5-LO^{-/-}, was investigate by measuring oxyhaemoglobin, haemoglobin derivatives, oxygen uptake, induction time (T^{ind}) and chemiluminescence (CL), initiated with *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHT). Our data suggest that LTs does not participate in the development of the anemia during the acute phase of *T. cruzi* infection. We showed that the NDGA treated-infected mice lessened erythrocyte oxidative stress that grows in the sharp phase of the infection. We found that the increase of erythrocyte oxidative stress during an acute phase of *T. cruzi* infection. 5-LO^{-/-} mice also presented smaller oxidative stress than control mice. The treatment with NDGA and lacking of 5-LO gene significantly increased blood and cardiac parasitism (day 12 after infection). NO production by activated macrophages was reduced so much in NDGA-treated mice as those where the 5-LO gene is absent. Our data indicate for the first time that LTs are essential in the control of load parasitic in the blood, cardiac tissue, systemic oxidative stress as well as in the regulation of the NO production by activated macrophages during the acute phase of the experimental *T. cruzi* infection.

Keywords: Experimental Pathology. *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Nitric oxide Red.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HETE	-	Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico
5-HPETE	-	Ácido 5-hidoperoxi-eicosatetraenóico
5-LO	-	5-Lipoxigenase ou Araquidonato 5-lipoxigenase
AAPH	-	2,2 Azobis (2-amidinopropano) hidrocloreto
Alox-5	-	Araquidonato 5-lipoxigenase
5-LO^{-/-}	-	“Nocaute” para araquidonato 5-lipoxigenase
BLT1/2	-	Receptor para leucotrieno B ₄
cisLT	-	Cisteinil leucotrieno
FLAP	-	Proteína de ligação à 5-lipoxigenase
HB	-	Hemoglobina
iNOS	-	Óxido nítrico sintase induzível
iNOS KO	-	“Nocaute” para óxido nítrico sintase induzível
ISC	-	Células esplênicas de camundongo infectado com <i>T. cruzi</i>
KO	-	Nocaute (Knock-Out)
L[·]	-	Radical lipídico
LO[·]	-	Radical alcóxil
LOO[·]	-	Radical peróxil
LOOH	-	Hidroperóxido lipídico
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LT	-	leucotrieno
M.O.	-	Medula Óssea
NDGA	-	Ácido Nordihidroguaiarético
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
ONOO⁻	-	Peroxinitrito
PAMP	-	Padrão molecular associado a patógeno
PEC	-	Células do exsudato peritoneal
QL	-	Quimiluminescência
ROI	-	Intermediário reativo de oxigênio
ROS	-	Espécie reativa de oxigênio
SC	-	Células esplênicas
SRS-A	-	Substâncias de reação lenta da anafilaxia

t-BHP	- <i>tert</i> -Butil hidroperóxido
Tc-Ag	- Antígeno de <i>T. cruzi</i>
T^{ind}	- Tempo de indução
TLR	- Receptor "Toll-Like"
TS	- Trans-sialidase
URL	- Unidade Relativa de Luz
WT	- Tipo selvagem (Wild Type)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese dos leucotrienos.....	32
Figura 2 – Parasitemia de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	51
Figura 3 – Sobrevivência de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	52
Figura 4 – Quantificação de ninhos de amastigotas de <i>T. cruzi</i> no miocárdio camundongos C57BL/6 e 129 no 12º dia pós-infecção	54
Figura 5 – Efeito do tratamento com inibidor da 5-lipoxigenase (5-LO), NDGA na produção de NO em células do exsudato peritoneal –PEC	56
Figura 6 – Efeito do tratamento com inibidor da 5-lipoxigenase (5-LO), NDGA na produção de NO em células esplênicas (SC)	57
Figura 7 – Viabilidade das PEC após 24 horas de incubação	58
Figura 8 – Células da M.O. de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	62
Figura 9 – Espectro de hemoglobina de eritrócitos de camundongos normais e infectados <i>T. cruzi</i>	64
Figura 10 – Estresse oxidativo em eritrócitos de camundongo C57BL/6 durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	67
Figura 11 – Estresse oxidativo em eritrócitos de camundongo 129 durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	68
Figura 12 – Quimiluminescência iniciada por <i>tert</i> -butil hidroperóxido (<i>t</i> -BHP) em eritrócitos de camundongos.....	69
Figura 12A – Quimiluminescência iniciada por <i>tert</i> -butil hidroperóxido (<i>t</i> -BHP) em eritrócitos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	70
Figura 13 – Quimiluminescência iniciada por <i>tert</i> -butil hidroperóxido (<i>t</i> -BHP) em eritrócitos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores hematológicos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> no 12º dia de infecção	60
Tabela 2 – Células nucleadas da medula óssea de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> no 12º dia de infecção.....	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DOENÇA DE CHAGAS	16
1.2 DOENÇA DE CHAGAS HUMANA.....	18
1.3 DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL	20
1.3.1 Modelo Animal.....	20
1.3.2 Camundongos geneticamente modificados.....	22
1.4 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	23
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
1.5.1 Radicais Livres	24
1.5.2 Enzimas Antioxidantes	26
1.5.2.1 Superóxido dismutase (SOD).....	27
1.5.2.3 Catalase (CAT).....	27
1.5.3.3 Sistema antioxidante dependente de glutathione.....	27
1.5.3.4 Avaliação do estresse oxidativo	28
1.5.4 Radicais Livres e a Infecção por <i>T. cruzi</i>	29
1.6 LEUCOTRIENOS.....	30
1.7 ÁCIDO NORDIHDROGUAIAARÉTICO (NDGA)	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 SOLUÇÃO DE <i>T</i> -BUTIL HIDROPERÓXIDO (<i>T</i> -BHP)	37
3.3 PARASITAS E INFECÇÃO	38
3.4 TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM ÁCIDO NORDIHDROGUAIAARÉTICO	38
3.5 ANÁLISE HEMATOLÓGICA DOS ANIMAIS NORMAIS E INFECTADOS	39
3.5.1 Contagem do número de eritrócitos e plaquetas.....	39
3.5.2 Determinação do hematócrito (HMT)	40
3.5.3 Dosagem de Hemoglobina (HB): método da cianometahemoglobina.....	40
3.5.3.1 Cálculo para o fator de calibração.....	41
3.5.3.2 Cálculo para determinação da concentração de hemoglobina.....	41

3.5.3.3 Reagente de Drabkin (Líquido de Van Kempeu).....	41
3.5.4 Preparação das Soluções Padrão.....	41
3.5.5 Análise Hematológica para Determinação dos Índices Leucométricos	42
3.5.5.1 Contagem de leucócitos	42
3.5.5.1.1 Cálculo do número de leucócitos na câmara de Neubauer	43
3.6 COLETA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA	43
3.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	44
3.7.1 Preparação de Papa de Eritrócitos.....	44
3.7.2 Determinação do espectro de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicrômio dos eritrócitos obtidos dos camundongos normais e infectados	44
3.7.3 Avaliação do consumo de oxigênio, por eritrócitos obtidos de camundongos normais e infectados, após indução da lipoperoxidação com <i>t</i> -butil hidroperóxido	44
3.7.4 Avaliação da lipoperoxidação (LPO) por quimiluminescência iniciada por <i>t</i> -butil hidroperóxido (<i>t</i> -BHP)	45
3.7.4.1 Padronização da técnica de quimiluminescência para eritrócitos de camundongos	45
3.7.4.2 Avaliação da lipoperoxidação por quimiluminescência iniciada por (<i>t</i> -BHP) em eritrócitos de camundongo normais e infectados.....	46
3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	47
3.9 CULTURA DE MACRÓFAGOS.....	47
3.10 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS.....	48
3.11 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	48
3.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	49
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 A 5-LIPOXIGENASE PARTICIPA DO CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i>	50
4.1.1 Parasitemia e Sobrevida	50
4.1.2 Parasitismo Cardíaco	52
4.2 A 5-LIPOXIGENASE E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NÃO ESTÃO ENVOLVIDAS NO PROCESSO GERADOR DA ANEMIA, TROMBOCITOPENIA E HIPOPLASIA MEDULAR DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i>	55

4.3 O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA 5-LO REDUZ A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	59
4.4 O BLOQUEIO DA 5-LO ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO COM <i>T CRUZI</i> DE MANEIRA DEPENDENTE DE NO.....	62
4.4.1 Avaliação do consumo de oxigênio e tempo de indução (T ^{ind})	65
4.4.2 Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos por quimioluminescência iniciada pelo <i>tert</i> -butil hidroperóxido.....	66
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS	78
MANUSCRITO	94

I INTRODUÇÃO

1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI* E DOENÇA DE CHAGAS

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), um protozoário da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, foi descoberto por Carlos Chagas em 1907 em animais silvestres e domésticos. Em 1909 Carlos Chagas descreveu o primeiro caso humano da doença causada pelo *T. cruzi*, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

Atualmente a Organização Mundial de Saúde estima que de 11 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, especialmente na América Latina (WHO, 2002). A melhora nas condições de moradia e a iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas contribuíram para o declínio na transmissão da infecção nos países endêmicos (SCHOFIELD & DIAS, 1999).

T. cruzi possui um único flagelo e um cinetoplasto rico em DNA e seu ciclo de vida envolve passagens em hospedeiros vertebrados e invertebrados da Classe Hemiptera, Família Reduviidae e Sub-Família Triatominae (DE SOUZA, 1984).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é matéria de estudo a quase um século e três formas evolutivas são identificáveis com base na emergência do flagelo e na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular. Na forma infectante do parasito denominada tripomastigota o cinetoplasto situa-se posteriormente ao núcleo e o flagelo emerge da bolsa flagelar situada próxima ao cinetoplasto (DE SOUZA, 1984). As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, encontradas no sangue periférico do hospedeiro mamífero, podem apresentar-se como forma delgada ou forma larga (TYLER & ENGMAN, 2001).

Os tripomastigotas invadem as células do hospedeiro por um mecanismo que envolve o acoplamento do parasito à membrana citoplasmática. Através de padrões de seqüências moleculares associadas ao patógeno (PAMPs), como por exemplo âncoras de GPI que são reconhecidos por receptores "Toll-like" do complexo TLR2 – TLR6 e TLR4 (GAZZINELLI & DENKERS, 2006) o parasito adere à membrana, induzindo o recrutamento e fusão dos lisossomos com esse

ponto da membrana (TARDIEUX *et al.*, 1992), permitindo formação de um vacúolo e a entrada do parasito (ANDRADE e ANDREWS, 2005).

O pH ácido dentro desse vacúolo estimula a secreção, pelo parasito, de uma molécula chamada Tc-Tox, que permite a saída do parasito para o citoplasma da célula (ANDREWS, 1993). Posteriormente formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, formas arredondadas com flagelo curto, que se multiplicam por divisão binária dentro da célula do hospedeiro. Após diversos ciclos de divisão as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e através do sangue e da linfa, invadem outras células e o ciclo recomeça (TYLER & ENGMAN, 2001). As formas amastigotas também são infectantes, principalmente para células fagocitárias, embora por mecanismo distinto daquele utilizado por formas tripomastigotas (LEY *et al.*, 1988).

Os insetos transmissores (Reduviidae) ao fazerem seu repasto ingerem o sangue dos mamíferos infectados contendo as formas tripomastigotas sanguíneas e até 10% de amastigotas (TYLER & ENGMAN, 2001) que atravessam o aparelho digestório do inseto e transformam-se em epimastigotas, onde o flagelo e o cinetoplasto estão em posição anterior ao núcleo. Ao atingirem o reto do inseto as formas epimastigotas aderem-se ao epitélio e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) que são eliminados nas fezes e urina do inseto (PEREIRA, 1990). A contaminação das mucosas e do ferimento provocado pela “picada” do inseto com as excretas contendo as formas tripomastigotas metacíclicas leva à infecção. Recentemente, foi mostrado que a rota anatômica preferencial utilizada pelo *T. cruzi* após invasão da conjuntiva envolve a passagem dos parasitos através do ducto nasolacrimal para a cavidade nasal (GIDDINGS, *et al.*, 2006).

T. cruzi também pode ser transmitido por via congênita, transplante de órgãos e transfusões sanguíneas (BRENER, 1973; DIAS, 1979). Embora muitos países da América Latina adotem a triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue, estima-se que de 0,1% a 24,4% das infecções por *T. cruzi* ocorrem através de transfusão sanguínea (WHO, 2002).

1.2 DOENÇA DE CHAGAS HUMANA

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

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

A infecção caracteriza-se por uma fase aguda, com parasitemia intensa e sintomas como febre, fadiga e inchaço glandular. Nessa fase o parasito se dissemina pelo organismo, invade tecidos e órgãos e se multiplica. Em seguida a parasitemia é parcialmente controlada, sem eliminação completa do parasito 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%) 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 doença inflamatória crônica (forma crônica determinada) com dilatação cardíaca cerca de 15 a 30 anos após o início da infecção. 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).

Os mecanismos envolvidos nas lesões teciduais da doença de Chagas não são bem conhecidos. Apesar de muitos autores postularem que a lesão se manifesta mesmo na ausência do parasito nos focos de tecido lesados (SANTOS-BUSCH & TEIXEIRA, 1974 e SOARES *et al.*, 2001), a utilização de técnicas de imunohistoquímica e moleculares sugere correlação entre a presença de *T. cruzi* (HIGUSHI *et al.*, 1993), a quantidade de parasitos (TARLETON, 1995) ou seu DNA (JONES *et al.*, 1993, TARLETON *et al.*, 1997) e o grau de inflamação e lesão cardíaca mostrando que baixas quantidades de parasitos permanecem no sangue e/ou tecido cardíaco.

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 parasito ou seus antígenos presentes no tecido (TARLETON, 2003, GIRONÈS & FRESNO, 2003; KIERSZENBAUM, 2005).

O tratamento medicamentoso para a doença de Chagas é capaz de curar de 70 a 100 % dos pacientes na fase aguda, com os medicamentos nifurtimox (Lampit, Bayer) ou benzonidazol (Rochagan, Roche), 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.

Experimentos utilizando plasmídeos contendo seqüências de DNA codificadoras da *trans*-sialidase (TS) (COSTA *et al.*, 1998), da proteína dois de formas amastigotas (ASP-2) (MACHADO *et al.*, 2006) de *T. cruzi* mostram certo nível de proteção e redução da infecção em camundongos, tornando-os candidatos interessantes para o desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas.

1.3 DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

1.3.1 Modelo Animal

A doença de Chagas, 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 por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). 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 imunidade adquirida e está diretamente ligada ao padrão de produção de citocinas (DOS REIS, 1997; ABRAHAMSOHN 1998; TALVANI, *et al.*, 2002). Nesse contexto a interleucina 12 (IL-12) é considerada essencial para o estabelecimento de uma imunidade mediada por células protetora durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1998). Essa citocina é capaz de estimular as células NK ("natural killer") e células T a secretarem IFN- γ , que exerce papel fundamental na ativação dos macrófagos para a produção de TNF- α (MUÑOZ-FERNANDES & FRESNO, 1992). Essas duas moléculas em conjunto estimulam o macrófago a produzir óxido nítrico (NO), o principal efector que controla a replicação intracelular do parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994).

Recentemente foi mostrado que também o IFN do tipo I co-estimula a síntese de NO na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, contribuindo para o controle da parasitemia em camundongos resistentes (COSTA *et al.*, 2006).

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 consiste em um mecanismo endógeno de prevenção de choque endotoxêmico promovido por altas concentrações de TNF- α (ABRAHAMSOHN, 1998).

Após a fase aguda da infecção, a ativação de células T CD₄⁺ e T CD₈⁺ e conseqüente produção de anticorpos líticos específicos e citocinas (Th1), moduladoras da função dos macrófagos, determina o controle da parasitemia pelos componentes da imunidade adquirida específica (DOS REIS & LOPES, 2000).

A infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos, em sua fase aguda, apresenta características semelhantes à infecção humana, tornando esse animal um modelo para estudo da infecção (LAGUENS *et al.*, 1980). Porém o curso da infecção varia de acordo com a idade, sexo, via de inoculação e a linhagem do animal (GOBLE, 1951). A linhagem C57BL/6 é referida como resistente à infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, enquanto a linhagem C3H e Swiss são consideradas susceptíveis e a linhagem BALB/c é descrita como relativamente susceptível (susceptibilidade intermediária) a essa mesma cepa de *T. cruzi* (TRISCHMANN *et al.*,1978; MALVEZI *et al.*, 2004).

No entanto, existem variações significativas no curso da infecção, relacionadas também com a cepa de *T. cruzi* utilizada (CORSINI *et al.*, 1980; ANDRADE *et al.*, 1985). Nesse contexto os camundongos C57BL/6, referidos como resistentes à cepa Y, são extremamente susceptíveis á infecção pela cepa Tulahuen de *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1992) e quando se utiliza a cepa SylvioX10 os camundongos C3H e C57BL/6, descritos como susceptíveis e resistentes respectivamente (à cepa Y), apresentam respostas opostas a esse padrão de susceptibilidade e resistência (POSTAN *et al.*,1983). Portanto como a base genética da susceptibilidade e resistência não é totalmente conhecida, é inapropriado referir-se a uma determinada linhagem de camundongo como susceptível ou resistente sem referência à cepa de *T.cruzi* utilizada para estabelecer a infecção (TARLETON, 1995).

De uma forma geral as taxas de mortalidade, tempo de sobrevida e parasitemia são avaliadas para se determinar à susceptibilidade ou resistência do animal. Camundongos susceptíveis normalmente desenvolvem altas parasitemias e

geralmente morrem entre duas e três semanas após o início da infecção, não sobrevivendo à fase aguda. Ao contrário, os camundongos resistentes apresentam parasitemia menos intensa, que é controlada e o animal sobrevive à infecção (ANDRADE *et al.*, 1985).

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

A linhagem BALB/c, é bastante utilizada para experimentos com drogas antiparasitárias e agentes imunomoduladores (ARAÚJO-JORGE, 2000), enquanto a linhagem C3H se presta muito bem a estudos envolvendo resposta inflamatória e imunológica durante a infecção por *T. cruzi* (MINOPRIO *et al.*, 1989). A linhagem C57BL/6, descrita como resistente à infecção por várias cepas de *T. cruzi* tem sido utilizada por vários pesquisadores (REED *et al.*, 1984, PINGE-FILHO, 1993, PINGE-FILHO *et al.*, 1999) para o estudo da infecção por *T. cruzi*. O camundongo Swiss, não isogênico, considerado como susceptível às diversas cepas de *T. cruzi* é bastante utilizado em experimentos com grande número de animais, por seu baixo custo (GUTTERIDGE *et al.*, 1978). A descrição das cepas Y e CL como polares em relação à parasitemia e tropismo tecidual (MELO & BRENER, 1978) foi realizada utilizando-se o camundongo Swiss como modelo experimental.

1.3.2 Camundongos geneticamente modificados

Atualmente utilizam-se camundongos geneticamente modificados, deficientes em um gene específico (e seu produto), chamados nocautes (“Knock-out” -KO) em modelos experimentais aplicados a diversas infecções. Camundongos KO para genes que expressam moléculas de classe I do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) (TARLETON *et al.*, 1992) e classe II do MHC (ROTTENBERG *et al.*, 1993); para genes RAG e de IL-10 (ABRAHAMSOHN & COFFMANN, 1996, HUNTER *et al.*, 1997) e genes responsáveis pela expressão da

iNOS (Óxido Nítrico Sintase – induzível) (MALVEZI et al., 2004) têm contribuído para uma melhor compreensão da imunopatologia da doença de Chagas.

A partir dos resultados de Chen e colaboradores em 1994, tornou-se disponível um novo modelo de camundongo deficiente em 5-LO (5-Lipoxigenase), ou seja, incapaz de produzir leucotrienos. Recentemente, estudos que utilizaram estes animais mostraram que os leucotrienos exercem papel fundamental no controle da infecção experimental com *Strongyloides venezuelensis* (MACHADO et al., 2005) e com *Leishmania amazonensis* (SEREZANI et al., 2006).

Então, a perspectiva existente no final da década de 1990, para a utilização de novos modelos de camundongos nocautes, transformou-se em realidade e tem permitido nos últimos anos a realização de investigações que ajudam na compreensão da evolução da patogenia da doença de Chagas. A utilização de camundongos deficientes em MYD88 (CAMPOS et al., 2004) e nos receptores TLR4 (KOGA et al., 2006) são bons exemplos do ocorrido.

1.4 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

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). Camundongos experimentalmente inoculados 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 parasitemia 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.

Recentemente Tribulatti e colaboradores (2005) mostraram que através da *trans*-sialidase, o *T. cruzi* transfere o ácido siálico das plaquetas para suas estruturas, tornando as plaquetas 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).

O fato de que 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) e que as citocinas, como o TNF- α , podem provocar efeito supressivo sobre os precursores eritróides na medula (ROODAMNN *et al.*, 1987; MALVEZI *et al.*, 2004) durante a infecção experimental com *T. cruzi*, sugere 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 com *T. cruzi* é geralmente acompanhada por lipoperoxidação dos eritrócitos com a participação do NO (óxido nítrico) (MALVEZI *et al.*, 2004) indicando que os radicais livres resultantes do estresse oxidativo provocado tanto pelo parasito, quanto pela resposta imunológica antiparasitária pode ter papel importante na geração da lesão dos eritrócitos.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

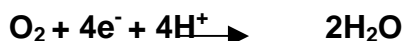
1.5.1 Radicais Livres

O radical livre é definido como uma molécula de existência independente que possui um ou mais elétrons não emparelhados em um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Durante o processamento molecular do oxigênio pelas mitocôndrias, cerca de 1 a 5% dos elétrons escapam da cadeia respiratória e formam espécies reativas de oxigênio (ROS) (SCHANAIDER, 2000), os radicais livres. Esses radicais reagem com moléculas transformando-as em moléculas reativas capazes de transferir elétrons para outras moléculas não radicais, tornando-as radicais.

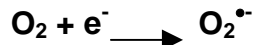
Os principais radicais livres são: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}), halaminas, oxigênio singleto, entre outros. As células possuem mecanismos anti-oxidantes como enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase que as protegem da ação desses radicais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Quando a formação dos radicais livres excede a capacidade da célula de removê-los, os efeitos lesivos desses radicais tornam-se predominantes gerando estresse oxidativo.

A origem desses radicais está representada nas equações abaixo (BABIOR, 1997).

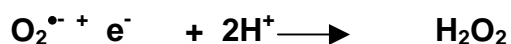
A redução da molécula de oxigênio para duas moléculas de água é a maior fonte de energia nos sistemas biológicos aeróbicos. Essa redução necessita de quatro elétrons:



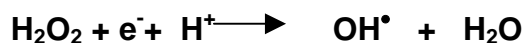
Mas se os elétrons são transferidos um a um para o oxigênio, uma série de produtos parcialmente reduzidos são gerados. O primeiro desses produtos é o superóxido ($O_2^{\bullet-}$):



A redução do $O_2^{\bullet-}$ pelo segundo elétron produz peróxido de hidrogênio:



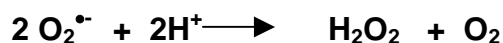
O radical hidroxila e a primeira molécula de água surgem quando o terceiro elétron é transferido para o peróxido de hidrogênio:



Finalmente, o quarto elétron produz a segunda molécula de água a partir do radical hidroxila:



Ao contrário da maioria das moléculas com elétrons não pareados, o ânion superóxido é surpreendentemente inerte e sua principal reação é com outra molécula de superóxido para formar água oxigenada:



É também uma base fraca, sendo seu conjugado ácido, o radical hidroperóxil, muito mais reativo:



Esses radicais formados nessas reações também participam de outras reações como a reação de Haber-Weiss:



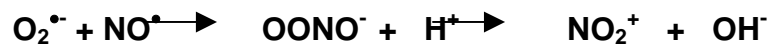
e a reação de Fenton:



O superóxido também reage com hidroxila para formar oxigênio singleto:



e com o óxido nítrico para formar peroxinitrito, um radical altamente oxidante:



O óxido nítrico participante da reação acima é gerado a partir da *L*-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na presença de O_2 e NADPH (PALMER & MONCADA, 1989), principalmente por macrófagos ativados.

Em adição, o peróxido de hidrogênio formado por dismutação do superóxido é utilizado por fagócitos para formar ácidos hipohalosos (como HOCl), compostos altamente reativos que reagem com aminas para produzir halaminas (como NH_2Cl), que podem ser ainda mais reativas que os ácidos hipohalosos. O ácido hipohaloso também pode reagir com o peróxido de hidrogênio para formar oxigênio singleto:

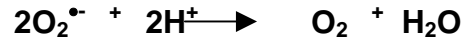


1.5.2 Enzimas Antioxidantes

A remoção dos radicais livres é realizada principalmente por quatro enzimas que compreendem três sistemas:

1.5.2.1 Superóxido dismutase (SOD).

Essa enzima catalisa a conversão do superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em oxigênio e água:

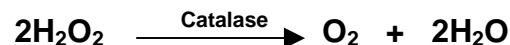


Embora a dismutação espontânea seja rápida, a SOD acelera bastante a reação (FRIDOVICH, 1995).

Duas formas de SOD estão presentes nas células eucarióticas, uma que contém Cu^{2+} e Zn^{2+} (CuZnSOD) encontrada no citosol, e outra que contém Mn^{2+} (MnSOD) localizada na mitocôndria. Ao contrário da CuZnSOD que não é afetada pelo estresse oxidativo, a MnSOD é induzível e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BABIOR, 1997).

1.5.2.3 Catalase (CAT)

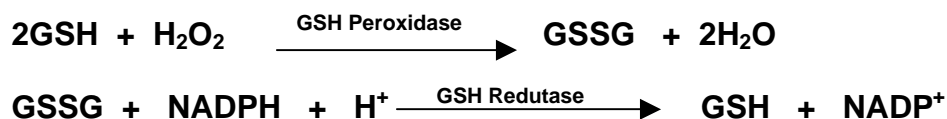
O peróxido de hidrogênio é controlado por dois sistemas, catalase e sistema antioxidante dependente de glutatona que convertem o peróxido em água às custas de NADPH. A catalase catalisa a transformação de H_2O_2 em água e oxigênio:



Cerca da metade do H_2O_2 produzido é destruído pela catalase (BABIOR, 1997).

1.5.3.3 Sistema antioxidante dependente de glutatona

Esse sistema é composto de glutatona (GSH) mais duas enzimas, glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GSR) e seu funcionamento está baseado no ciclo da GSH entre a forma oxidada e a forma reduzida:



1.5.3.4 Avaliação do estresse oxidativo

Devida a sua alta reatividade, os radicais livres têm 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 conseqüente 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, conseqüência 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[•] ou LO[•] (radical alcóxil), formando o L[•] (radical lipídico). O L[•] reage rapidamente com o O₂ formando LOO[•] (radical peróxil) que remove novo hidrogênio do ácido graxo formando novamente o L[•] 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[•] e LOO[•] destroem a si próprios.

A determinação dos níveis de glutatona, 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).

1.5.4 Radicais Livres e a Infecção por *T. cruzi*

Evidências da participação dos macrófagos no controle da infecção por *T. cruzi* foram mostradas nos experimentos de HOFF (1975) e NOGUEIRA & COHN (1978) que observaram que macrófagos de animais imunizados com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) apresentam 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, H₂O₂ (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 inibe a atividade tripanocida (MCABE & MULLINS, 1990) desses macrófagos. Mais tarde foi mostrado que a atividade tripanocida dos macrófagos é dependente principalmente da produção de óxido nítrico (GAZZINELLI *et al.*, 1992, VESPA *et al.*, 1994).

A habilidade do *T. cruzi* para resistir aos radicais livres está relacionada com a presença de mecanismos como a tripanotona e enzimas relacionadas que estão envolvidos 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 intermediários reativos de oxigênio, (ROI), tem papel importante nas lesões teciduais ocorridas durante a infecção. Modificações na estrutura do retículo endoplasmático liso, provavelmente devido á produção de O₂^{•-} e H₂O₂ 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) mostram que alterações na cadeia respiratória mitocondrial são fontes de produção de ROI nos miócitos de camundongos C3H/HeN infectados com *T. cruzi* e que a severidade da miocardiopatia nesses animais está relacionada com o aumento no dano oxidativo, demonstrado pelo aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) e proteína carbonílica e redução dos mecanismos antioxidantes das células (por exemplo a SOD). Neste cenário, a terapia antioxidante atenua o estresse oxidativo associado à miocardiopatia na doença de Chagas (MAÇAO *et al*, 2007).

O estresse oxidativo dos eritrócitos aparentemente acompanha o desenvolvimento da miocardiopatia na doença de Chagas crônica (OLIVEIRA *et al*, 2006)

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.

1.6 LEUCOTRIENOS

Leucotrienos (LT) são produzidos de segundos a minutos após o estímulo apropriado, a partir da metabolização do ácido araquidônico (AA) pela araquidonato 5-lipoxigenase (5-LO ou Alox-5) (LEWIS *et al*, 1990). A liberação do AA dos fosfolípidos de membrana é realizada por enzimas da família da fosfolipase A₂, principalmente fosfolipase A₂ citossólica (cPLA₂) (DIAZ & ARM, 2003). O AA livre é então convertido em ácido 5-hidroperóxi-eicosatetraenóico (5-HPETE) e, subsequentemente oxigenado no carbono cinco por meio da 5-LO com auxílio de uma proteína de ligação ao AA chamada proteína de ativação da 5-LO (FLAP), para formar o leucotrieno A₄ (LTA₄) (ROUZER *et al*, 1986). A seguir o LTA₄ é hidrolisado pela LTA₄ hidrolase formando leucotrieno B₄ (LTB₄), principalmente nos neutrófilos e células dendríticas, ou conjugado com glutatona reduzida, pela LTC₄ sintase, para formar leucotrieno C₄ (LTC₄), principalmente nos eosinófilos, basófilos e mastócitos

(NICHOLSON *et al.*, 1993). O LTC₄ é liberado no meio extracelular onde é convertido em LTD₄ pela enzima gama-glutamil transpeptidase (γ -GT) (ANDERSON *etal.*, 1982) ou, mais eficientemente, pela gama-glutamil leucotrienase (γ -GL) (CARTER *etal.*, 1998) e a seguir em LTE₄ pela dipeptidase (LEE *et al.*, 1983). LTE₄ é excretado na urina sem modificações adicionais.

LTC₄, LTD₄ e LTE₄ coletivamente chamados cisteinil leucotrienos (cisLT) foram originalmente identificados como substâncias de reação lenta da anafilaxia (SRS-A) e possuem ação vasodilatadora e broncoconstritora, enquanto o LTB₄ é quimioatraente e ativador de leucócitos. Macrófagos estimulados produzem quantidades balanceadas de LTB₄ e cisLT (PETERS-GOLDEN *etal.*, 2004). As vias para a síntese dos leucotrienos são apresentadas na figura 1.

Os efeitos biológicos dos LT são mediados pela ligação a receptores ligados à proteína G (TAGER & LUSTER, 2003; KANAOKA & BOYCE, 2004). LTB₄ e cisLT ligam-se a receptores BLT1/2 e cisLT1/2 respectivamente, mas a maioria dos efeitos conhecidos dos LT são mediados via receptores BLT1 e cisLT1. Esses receptores ligados a G_q e G_i modulam a sinalização de cadeias envolvendo fosfolipase C/Ca⁺⁺ intracelular/Proteína quinase C, adenil ciclase, MAPK, PI3K, Rac e NF- κ B (PETERS-GOLDEN, *etal.*, 2004).

As funções efetoras envolvidas na imunidade inata, influenciadas pelos LT, incluem efeitos diretos no recrutamento e ativação de fagócitos e efeitos indiretos através da estimulação da formação de outras moléculas inflamatórias (PETERS-GOLDEN, *et al.*, 2004). O LTB₄ além de induzir a migração de neutrófilos, também influencia o tráfego de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (TAGER *et al.*, 2003), enquanto os cisLT influenciam o tráfego de células dendríticas para os sítios de estimulação antigênica (PARAMESWARAN *et al.*, 2004), bem como para os linfonodos (ROBBIANI *et al.*, 2000).

Os leucotrienos são importantes não apenas na inflamação, mas sua participação na imunidade inata também tem sido descrita no controle de infecções virais por citomegalovírus (GOSSELIN *et al.*, 2005), nas infecções bacterianas como as causadas por *Klebsiella pneumoniae* (MANCUSO *et al.*, 2001) e infecções por fungos do gênero *Histoplasma* (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Nas parasitoses os leucotrienos participam tanto no controle da infestação por *Strongyloides* (MACHADO *et al.*, 2005), quanto no controle da infecção por *Leishmania* (SEREZANI *et al.*, 2006).

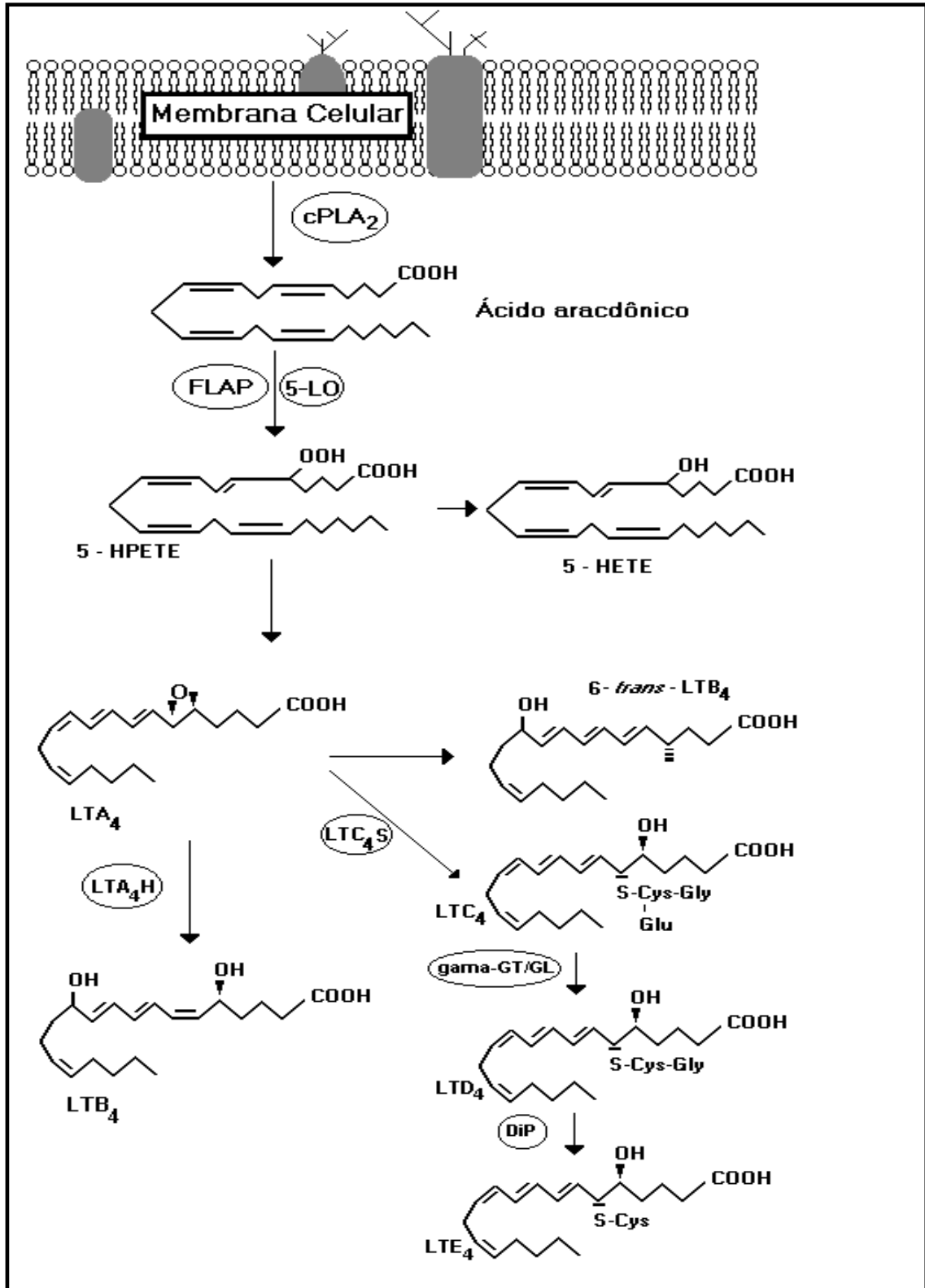


Figura 1 – Biossíntese dos leucotrienos. cPLA₂: fosfolipase A₂ citossólica; 5-LO: 5-lipoxigenase; FLAP: proteína de ligação a 5-LO; 5-HPETE: ácido 5-hidroperóxi-eicosatetraenóico; LTA₄H: LTA₄ hidrolase; LTC₄ S: LTC₄ sintase; gama GT/GL: gama glutamil transpetidade/leucotrienase; Dip: dipeptidase; 6-*trans* LTB₄:metabólito inativo.

Durante a infecção com *T. cruzi* LTB₄ e LTC₄ aumentam a capacidade dos macrófagos para fagocitar o parasito (WIRTH & KIERSZENBAUN, 1985). Mais especificamente a ativação de macrófagos com LTB₄ induz a produção de TNF- α que tem efeito autócrino nos macrófagos induzindo a produção de NO (TALVANI *et al.*, 2002), a principal molécula responsável pelo controle da infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Muitos dos efeitos do LTB₄ são parcialmente dependentes da liberação de um segundo mediador como o fator ativador de plaquetas (PAF), como demonstrado por Talvani e colaboradores (2002).

Esses pesquisadores mostraram que a ativação de macrófagos com LTB₄ está associada ao controle da multiplicação do parasito e relataram também o aumento na parasitemia, parasitismo cardíaco e redução da sobrevivência de camundongos C57BL/6 deficientes em PAF e infectados com *T. cruzi*.

Os leucotrienos (LTB₄ e cisLT) também induzem rápido aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) por neutrófilos e macrófagos, que, embora não sejam críticos para o controle da multiplicação do parasito, podem estar associados às lesões celulares conseqüentes ao estresse oxidativo (GARG *et al.*, 2003).

1.7 ÁCIDO NORDIHIIDROGUAIAIRÉTICO (NDGA)

O Ácido Nordihidroguaiarético (NDGA) é um lignano obtido a partir do arbusto creosoto (chaparral, governadora ou hediondilla), comum nas Américas Latina e do Norte (ARTEAGA *et al.*, 2005). O arbusto creosoto pertence à família Zygophyllaceae que inclui mais de 30 gêneros e aproximadamente 250 espécies (JONES, 1987) sendo as espécies *Larrea tridentata* e *Larrea divaricata* duas fontes comuns do NDGA, que é obtido das flores, galhos finos e verdes e das folhas, que contem as concentrações mais altas, 38,3 mg/g (HYDER *et al.*, 2002). O NDGA possui potente ação antiinflamatória, provavelmente em função da sua capacidade de inibir a enzima lipoxigenase (SALARI *et al.*, 1984).

Clinicamente o único uso reportado do NDGA é no tratamento da Síndrome de Sjogren-Larsson, uma desordem neurocutânea devido a um distúrbio na degradação do leucotrieno B₄ (WILLENSEN, 2000).

Vários estudos experimentais sugerem que o NDGA pode ter um papel na terapia do câncer. Birkenfeld e colaboradores (1987) demonstraram que o uso do NDGA na dose de dois mg/dia por via oral durante uma semana inibe a toxicidade hepática e a promoção de tumor renal pelo nitriltriacetato férrico em camundongos.

Também foi mostrado que o NDGA pode ser um agente quimioprotetor no câncer de pulmão (SORIANO *et al.*, 1999) e câncer de pele (GONZÁLES & BOWDEN, 2002) e suprime o crescimento de células de câncer de mama (EARASHI, 1995). Esses estudos apontam para dois modos de ação do NDGA: o primeiro como antioxidante, prevenindo o efeito deletério das espécies reativas de oxigênio e o segundo como um agente que afeta a expressão gênica provavelmente através de seu efeito na síntese de leucotrienos.

A administração de NDGA diminui significativamente o dano oxidativo na nefropatia diabética induzida pelo estreptozotocina em camundongos, por um mecanismo de ação que vai além de sua interação direta com agentes oxidantes (ANJANEYULU, 2004).

O NDGA é um inibidor altamente eficiente da 5-LO, tanto “in vivo” quanto “in vitro”, agindo através da redução do ferro no sítio ativo da enzima, porém sua utilização é limitada por sua baixa biodisponibilidade por via oral (WERZ & STEINHILBER, 2006).

Portanto, para que se possa entender o papel dos leucotrienos na fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi*, decidimos investigar os efeitos do bloqueio da produção da 5-LO sobre o estresse oxidativo associado à anemia, produção de óxido nítrico e controle da carga parasitária.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Com base nos dados expostos anteriormente, investigamos o papel da 5-lipoxigenase no curso da infecção chagásica experimental, por meio do bloqueio de sua atividade com ácido nordihidroguaiarético (NGDA), e utilização de camundongos 129 5-LO^{-/-} (nocautes para 5-lipoxigenase). Para tal foram realizados ensaios para determinação dos parâmetros hematológicos, carga parasitária e análise do estresse oxidativo em eritrócitos provenientes de animais na fase aguda da infecção com *T. cruzi* (Cepa Y).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o papel da 5-LO sobre o curso da infecção experimental com *T. cruzi* realizando o bloqueio farmacológico com NDGA ou utilizando animais nocautes para 5-LO e controles selvagens (WT), por meio da determinação dos níveis de parasitemia, parasitismo no coração e sobrevivência de camundongos infectados com *T. cruzi* (cepa Y);

2.2.2. Correlacionar os níveis de parasitemia com o desenvolvimento da anemia associada ao estresse oxidativo que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi* cepa Y, utilizando dois modelos murinos: um de resistência (camundongos C57BL/6) e outro de susceptibilidade (C57BL/6 iNOS KO – deficientes na produção da óxido nítrico sintase induzível);

2.2.3 Avaliar efeito da ausência de 5-LO sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) e células esplênicas oriundas de camundongos infectados com *T. cruzi*.

2.2.4 Determinar o perfil de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicrômio em eritrócitos obtidos de camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO, 129sv (WT) e 129 5-LO^{-/-} infectados com *T. cruzi* e tratados ou não com NGDA.

2.2.5 Determinar o consumo de oxigênio e tempo de indução (T^{ind}) em eritrócitos obtidos de camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO, 129sv (WT) e 129 5-LO^{-/-} infectados com *T. cruzi* e tratados ou não com NGDA, após a indução da lipoperoxidação com *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP).

2.2.6 Determinar o nível de lipoperoxidação em eritrócitos obtidos de camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO, 129sv (WT) e 129 5-LO^{-/-} infectados com *T. cruzi* e tratados ou não com NGDA, através da quimiluminescência induzida por *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO, machos de 6 a 12 semanas de idade, obtidos do Biotério de animais isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e camundongos 129 5-LO^{-/-} (CHEN *et al*, 1994) e 129sv (WT) (controle selvagem -WT: “wild type”) obtidos do “Jackson Laboratory” - USA, gentilmente cedidos pelo professor Fernando Cunha da USP de Ribeirão Preto, SP e 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) esterilizadas por calor úmido foram distribuídos “*at libitum*”. Os grupos experimentais e controles foram constituídos por camundongos aproximadamente da mesma idade.

3.2 SOLUÇÃO DE T-BUTIL HIDROPERÓXIDO (T-BHP)

Soluções de *t*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) (Sigma, St. Louis, MO) 2 mM (utilizada para determinação de consumo de oxigênio) e 0,6 mM (utilizada para as reações de quimiluminescência), foram preparadas diluindo-se 63,5 µL e 19,3 µL de *t*-BHP em 1 mL de água destilada respectivamente, sob agitação vigorosa mantidas ao abrigo da luz. O *t*-BHP foi utilizado como indutor do consumo de oxigênio, (para cálculo do tempo de indução -T^{ind}) e quimiluminescência na avaliação do estresse oxidativo de eritrócitos, segundo Lissi e colaboradores (1986).

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 do *T. cruzi* "in vivo".

A avaliação da concentração de parasitos circulantes foi realizada 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).

Para a preparação do antígeno *T. cruzi* (Tc-Ag) os parasitos foram coletados de culturas de células LLC-MK2 - linhagem celular derivada de rim de macaco Rhesus (American Type culture collection, ATCC CCL7.1) e submetidos a 10 ciclos de congelamento e descongelamento e a seguir aliquotados e mantidos a -20°C até o uso (PINGE-FILHO *et al.*, 1999).

3.4 TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM ÁCIDO NORDIHDROGUAIARÉTICO (NGDA)

Camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO e 129sv (WT) foram inoculados ácido nordihidroguaiarético (1,4-bis[3,4-dihidroxyphenyl]-2,3-dimethylbutane - NDGA, Sigma, St Louis, USA), 50 mg/Kg, por via intraperitoneal. A primeira dose foi administrada 4 horas após a infecção com *T. cruzi*. O NDGA foi dissolvido em etanol e a seguir em PBS. Os camundongos receberam o tratamento com NGDA diariamente durante 12 dias ou até a morte dos animais. A partir do quinto dia depois da infecção foi realizada diariamente a avaliação da parasitemia como descrito anteriormente.

3.5 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 e logo após os animais foram sacrificados por deslocamento cervical como descrito por Araújo-Jorge (2000).

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).

3.5.1 Contagem do número de eritrócitos e plaquetas

A contagem de eritrócitos obtidos de camundongos (normais e infectados) foi realizada manualmente segundo Dacie e Lewis (1975). Amostras de sangue coletadas com EDTA ($v=50 \mu\text{L}$) foram transferidas para tubos de ensaio (12 x 75 mm) contendo 1,0 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 hemácias e plaquetas foi calculado da seguinte maneira:

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

[Fator final x eritrócitos contados em 80 quadrados menores da área central da câmara = Eritrócitos/ μL]

3.5.2 Determinação do hematócrito (HMT)

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 HMT foi expresso em porcentagem.

3.5.3 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 µL 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 µL 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:

3.5.3.1 Cálculo para o fator de calibração:

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

3.5.3.2 Cálculo para determinação da concentração de hemoglobina

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

3.5.3.3 Reagente de Drabkin (Líquido de Van Kempeu)

KH ₂ PO ₄	14,0 g
K ₃ (CN) ₆	20,0 g
KCN.....	5,0 g
H ₂ O (destilada).....	1000,0 mL

3.5.4 Preparação das Soluções Padrão

A preparação de soluções padrão de hemoglobina foi realizada a partir de um “pool” de amostras de sangue ($v = 2$ mL) obtidas de camundongos Swiss e C57BL/6 normais como descrito por Malvezi *et al.* (2004). As amostras foram colocadas em tubo de ensaio (10 X 100 mm) e centrifugadas a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados. Os eritrócitos foram ressuspensos e lavados (três vezes) por centrifugação (5 minutos, 2.500 r.p.m.) em solução salina 0,85%. Após a terceira centrifugação foi adicionado 1,5 mL de água destilada e agitado vigorosamente por dois minutos para completa

lise dos eritrócitos. Em seguida foram adicionados 2,5 mL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 2 minutos, centrifugou-se a 3.000 r.p.m. por 15 minutos. O sobrenadante (hemolisado) foi removido com pipeta de Pasteur e armazenado em tubo de ensaio com capacidade para 15 mL (Falcon) mantido a -20°C até o momento do uso.

Em seguida, a concentração de hemoglobina das diferentes amostras, foi determinada em equipamento Cell-Dyn 1600 (Abbott) e confirmada no equipamento Coulter T-890 (Coulter Electronics).

3.5.5 Análise Hematológica para Determinação dos Índices Leucométricos

3.5.5.1 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 1000 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 5 minutos. A seguir, após agitação, realizou-se a contagem dos leucócitos em câmara hematómica de Neubauer utilizando os quatro quadrantes laterais da câmara e objetiva de 40X.

3.5.5.1.1 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.

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

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

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos contados} \times 50 = \text{leucócitos por } \mu\text{L}$$

3.6 COLETA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

Células da medula óssea foram obtidas a partir de fêmures e tíbias segundo Tadokoro (2001). Resumidamente, com o auxílio de um bisturi e uma tesoura, foram removidos cuidadosamente a pele, músculos e tendões dos membros inferiores. A seguir as epífises ósseas foram removidas. Com ajuda de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha (0,4X13, 26G1/2, Becton Dickinson, Curitiba, PR) foi realizada a liberação da medula com um jato de 1 ou 2 mL de PBS no interior do osso. A medula colhida foi então homogeneizada e parte foi diluída a 1:10 em solução de citrato trissódico para as contagens de células em câmara hematimétrica de Neubauer (Hirschmann, Techcolor), nos quadrantes laterais. Parte da medula extraída foi transferida diretamente para a câmara hematimétrica de Neubauer para as contagens de megacariócitos.

Parte do homogeneizado obtido da medula óssea (20 μL) foi transferido para lâminas de vidro (26X76 mm) para confecção do esfregaço, que foi mantido em temperatura ambiente por 2 horas para secagem, corado pelo método de May-Grunwald-Giemsa. Foram realizadas as contagens e os resultados foram emitidos em valores absolutos.

3.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

3.7.1 Preparação de Papa de Eritrócitos

Amostras de sangue heparinizado (1mL) obtidas de camundongos normais e infectados foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de tampão fosfato (10 mM NaCl 0,9%, pH 7,2) e centrifugadas durante 10 minutos a 2000 r.p.m. para lavagem. Após três lavagens o sobrenadante foi descartado e a “papa” de eritrócitos foi mantida em banho de gelo durante a realização dos ensaios.

3.7.2 Determinação do espectro de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicrômio dos eritrócitos obtidos dos camundongos normais e infectados

Para preparação dos hemolisados, 10 μ L de papa de eritrócitos foram adicionados a 3,0 mL de água destilada em tubos de ensaio sob agitação vigorosa. A absorbância foi ajustada, quando necessário, entre 0.800 e 0.900 para se obter maior sensibilidade e padronização.

A varredura foi realizada em espectrofotômetro (Varion, serie 634) nos comprimentos de onda de 700 até 450 nm, com velocidade de 50 nm por minuto. As curvas foram obtidas através do programa Origin 6.0.

3.7.3 Avaliação do consumo de oxigênio, por eritrócitos obtidos de camundongos normais e infectados, após indução da lipoperoxidação com *t*-butil hidroperóxido

Uma suspensão de eritrócitos a 1% preparada pela adição de 30 μ L 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 (LISSI *et al.*, 1986; BAINY *et al.*, 1996). O início da reação se deu pela adição de 12 µL 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}).

$$nM O_2 = \frac{(190nM) \times (X) \times (\text{volume da incubação em mL})}{100}$$

3.7.4 Avaliação da lipoperoxidação (LPO) por quimiluminescência iniciada por *t*-butil hidroperóxido (*t*-BHP).

3.7.4.1 Padronização da técnica de quimiluminescência para eritrócitos de camundongos.

Para a padronização da técnica de quimiluminescência iniciada pelo *tert*-butil hidroperóxido, em eritrócitos de camundongo, foi utilizado sangue heparinizado de camundongo C57BL/6 normal preparado como descrito no item 3.7.1.

Para a determinação da curva de QL para eritrócitos normais, 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, 875 µL desta suspensão foi acrescida de 105µL de tampão a 37 °C e a reação foi iniciada pela adição de 20 µL de *t*-BHP 0,6 mM. A leitura de quimiluminescência foi acompanhada durante 20 minutos.

Para determinar a curva de QL para eritrócitos oxidados, uma alíquota de eritrócitos foi submetida ao estresse oxidativo moderado pela incubação com 2,2 Azobis (2-amidinopropano) hidróclorido (AAPH) 5 mM durante 2 horas.

O meio de incubação foi composto de eritrócitos a 1% e AAPH 5mM (100 μ L de eritrócitos, 9,9 mL de tampão e 0,01356g de AAPH). A mistura foi mantida ao abrigo da luz. A incubação foi realizada a 37 °C sob agitação constante de 100 r.p.m.

Deste meio de incubação foram retiradas 2 alíquotas: a primeira após incubação de 1 hora e a segunda, após 2 horas (5mL em cada tempo). Após incubação, as amostras foram mantidas em banho gelado por 10 minutos para parar a decomposição do AAPH em peróxil e os eritrócitos foram centrifugados a fim de obter-se a papa. Para a realização do ensaio de quimiluminescência, a amostra foi preparada da mesma maneira que para os eritrócitos normais.

3.7.4.2 Avaliação da lipoperoxidação por quimiluminescência iniciada por (*t*-BHP) em eritrócitos de camundongo normais e infectados.

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 mM. 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. Os resultados são expressos em unidade relativa de luz (URL).

Os valores de V_0 foram obtidos por regressão linear da parte ascendente da curva de quimiluminescência.

3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No 12º dia de infecção os animais foram sacrificados. O coração foi removido e fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas e a seguir seccionado no sentido transversal. Os cortes foram então embebidos em parafina, corados com hematoxilina/eosina (H&E) e então analisados em microscópio óptico (com aumento total de 400 vezes). O número de ninhos de amastigotas foi contado em uma área de 10 mm² por secção. Três secções foram contadas e o resultado foi emitido como a média das contagens nas três secções.

3.9 CULTURA DE MACRÓFAGOS

Três dias após a inoculação intraperitoneal de 1,5 mL de tioglicolato de sódio a 5% (v/v) os camundongos foram sacrificados e as células do exsudato peritoneal (PEC) foram coletadas em RPMI 1640, centrifugadas a 1200 r.p.m. e ressuspensas em RPMI 1640. As células (3.0×10^5) foram então plaqueadas em microplacas de 48 ou 96 cavidades e fundo chato (Nunc) e incubadas por 4 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células não aderentes foram removidas por três lavagens com PBS morno e as células aderentes ($1,5$ a $2,0 \times 10^5$) foram cultivadas em RPMI 1640 (suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL respectivamente), glutamina 0,05 mM, piruvato 1 mM) por mais 24 horas a 37°C em câmara úmida e atmosfera de 5% de CO₂ na presença ou não de NDGA na concentração final de 10 µM, lipopolissacarídeo (LPS de *E.coli* sorotipo 026:B6, Sigma, St Louis, USA) na concentração final de 1µg ou NDGA + LPS nas concentrações acima citadas.

Após o período de incubação o sobrenadante foi coletado e separado para as dosagens de nitrito acumulado, como indicador da concentração de óxido nítrico produzido pelos macrófagos.

A viabilidade das células aderentes (macrófagos) foi determinada pelo corante azul de Trypan, foi sempre superior a 95%.

3.10 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Células esplênicas foram coletadas de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (ISC), no 12º dia de infecção, camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com NDGA (50 mg/Kg) diariamente durante 12 dias (SCI+NDGA) ou de camundongos C57BL/6 normais (SC). Os órgãos foram macerados e os eritrócitos foram removidos por lise hipotônica com água destilada e as células esplênicas foram ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL respectivamente) (Sigma), glutamina 0,05 mM e piruvato 1 mM (meio RPMI 1640 completo). As células esplênicas de todos os grupos foram cultivadas (4×10^5 /mL) em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, em microplacas de 96 cavidades com fundo chato, em meio RPMI 1640 completo, e estimuladas com Tc-Ag (4×10^5 parasitos/cavidade) ou cultivados apenas na presença do meio RPMI 1640 completo.

Após 48 horas de cultura os sobrenadantes foram coletados para as dosagens de NO.

3.11 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A quantidade de óxido nítrico (NO) produzida pelos macrófagos foi determinada colorimetricamente através da dosagem de nitrito acumulado pela reação de Griess no sobrenadante das culturas.

O reagente de Griess, composto de 1,0 g sulfanilamide, 0,1 g Naphtyl ethylenediamine, 90 mL H₂O e 2,5 mL ácido fosfórico PA foi preparado imediatamente antes do uso e mantido no escuro.

A mistura reativa foi composta de 50 µL de sobrenadante mais 50 µL de reagente de Griess, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada em leitora de ELISA no comprimento de onda de 550 nm. A concentração de nitrito foi determinada através de uma curva padrão utilizando nitrito de sódio nas concentrações de 0 a 100 µM com uma concentração

mínima detectável de 1,5 μ M (STUEHR & NATHAN , 1989; PINGE-FILHO *et al.*,1999).

3.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Miller (1959). Para o cálculo das concentrações foi utilizado soro albumina bovina como padrão.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico “INSTAT” (GraphPad Prisma, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média +/- desvio-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.

4 RESULTADOS

4.1 A 5-LIPOXIGENASE PARTICIPA DO CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO COM *T. CRUZI*

4.1.1 Parasitemia e Sobrevida

Para investigar a participação da 5-LO (5-lipoxigenase) na fase aguda da infecção chagásica, utilizamos duas linhagens de camundongos, C57BL/6, considerado como resistente à infecção, e a linhagem 129 (Sv e 5-LO^{-/-}).

A figura 2 mostra o curso da infecção nesses camundongos infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* via intraperitoneal. O pico de parasitemia ocorreu no 9º dia de infecção na linhagem C57BL/6 e foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com NDGA em comparação com o grupo não tratado (Figura 2a). Na linhagem 129sv (WT) o maior pico de parasitemia também ocorreu no 9º dia de infecção e foi significativamente maior ($p < 0,05$), nos camundongos 129sv (WT) tratados com NDGA em comparação com os animais não tratados (Figura 2b). Porém os camundongos 129 apresentaram um segundo pico de parasitemia entre o 17º e o 19º dia de infecção, significativamente maior nos animais 129sv (WT) tratados com NDGA e 129 5-LO^{-/-} em comparação com os animais 129sv (WT) não tratados (Figura 2b). Apesar da carga parasitária maior nos camundongos C57BL/6 tratados com NDGA em relação ao grupo não tratado, todos eles sobreviveram até o final do experimento, 40 dias após a infecção (Figura 3). Já no caso dos animais da linhagem 129 os grupos tratados com o inibidor NDGA e os grupos “knock-outs” para 5-LO tiveram uma taxa de sobrevivência significativamente menor ($p < 0,05$) em comparação com os grupos 129sv (WT) selvagens não tratados (Figura 3).

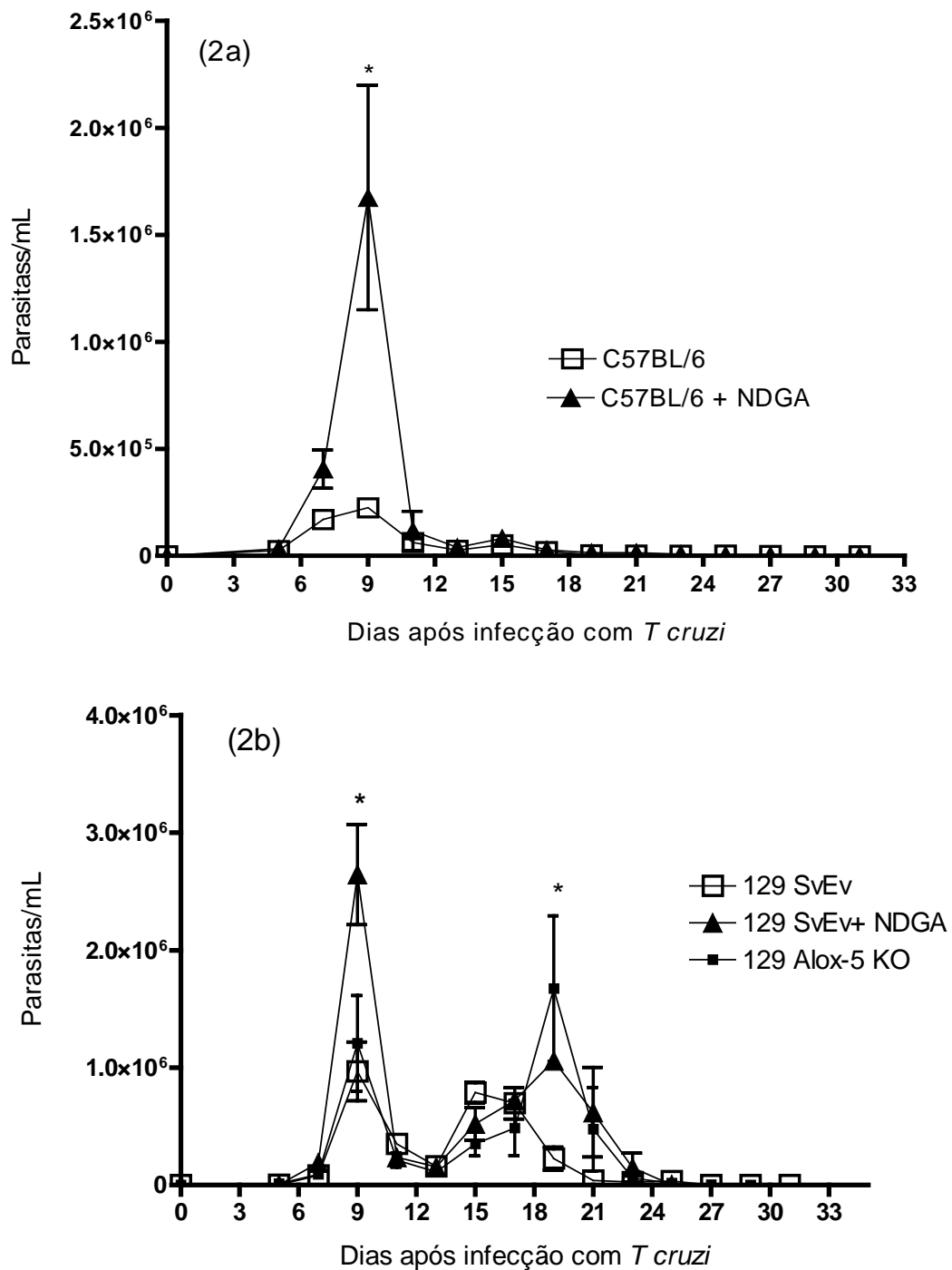


Figura 2 – Parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* pela metodologia de Pizzi e Brener. Camundongos C57BL/6, 129sv (WT) (WT) e 129 5-LO^{-/-} foram infectados com com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Parasitemia foi quantificada como tripomastigotas/mL de sangue. Os resultados são expressos como média \pm SD de 5 animais por grupo e são representativos de dois a cinco experimentos independentes. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, significativamente diferente (C57BL/6 vs C57BL/6 + NDGA (2a), 129sv (WT) + NDGA e 129 5-LO^{-/-}-vs 129sv (WT) (2b). WT: wild type (selvagem).

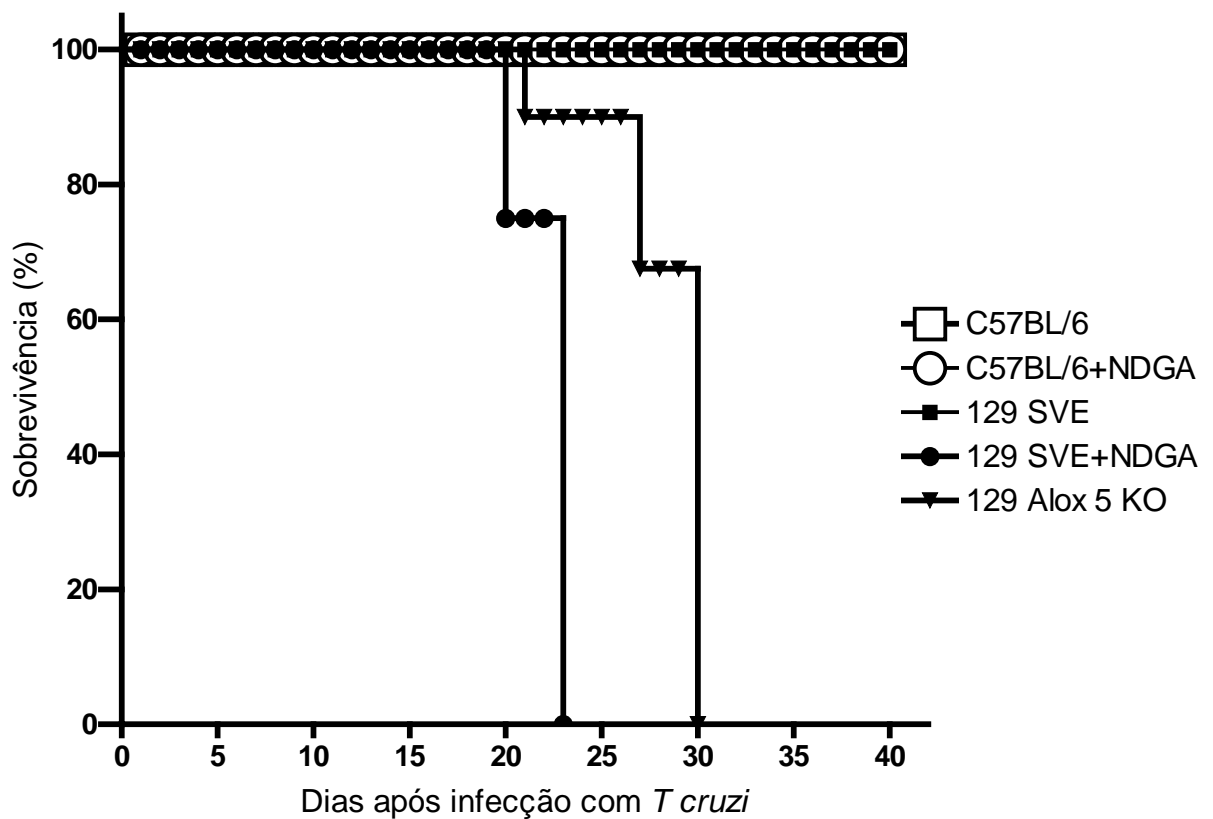


Figura 3 – Sobrevivência de camundongos infectados com *T. cruzi*. C57BL/6, 129sv (WT) e 129 5-LO^{-/-} foram infectados com com $5 \cdot 10^3$ formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y por via intraperitoneal. Os grupos tratados com NDGA (50 mg/Kg) receberam o tratamento 4 horas após a infecção e diariamente por via intraperitoneal durante 40 dias ou até a morte. Os resultados são expressos como média \pm SD de 5 animais por grupo e são representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente diferente para 129sv (WT) + NDGA e 129 5-LO^{-/-} vs 129sv (WT).

4.1.2 Parasitismo Cardíaco

A importância da produção endógena de leucotrienos sobre o parasitismo cardíaco foi investigada utilizando camundongos tratados com NDGA (50 mg/Kg) e camundongos deficientes em 5-LO.

O coração dos animais C57BL/6 infectados e tratados com NDGA apresentou 4 vezes mais ninhos de amastigotas (Figura 4a) em relação aos animais

infectados não tratados ($4,1 \pm 0,8$ versus $1,1 \pm 0,8$) ($p < 0,05$) (figura 4d) no 12^o dia pós-infecção. O tratamento com NDGA (50 mg/Kg) nos animais normais (não infectados) não provocou nenhuma alteração detectável no tecido cardíaco (figura 4b).

O tecido cardíaco dos animais 129sv (WT) infectados e tratados com NDGA (Figura 4f) e dos animais 129 5-LO^{-/-} (Figura 4g) apresentaram significativamente ($p < 0,05$) mais ninhos de amastigotas em relação aos animais 129sv (WT) infectados (Figura 4e).

Comparando-se o número de ninhos dos animais C57BL/6 (infectados e tratados com NDGA) com os animais da linhagem 129 (infectados e tratados com NDGA ou geneticamente deficientes em 5-LO) observou-se que os camundongos da linhagem 129 apresentaram número significativamente maior ($p < 0,001$) de ninhos ($4,1 \pm 0,8$ versus $26 \pm 1,3$) em comparação com os animais

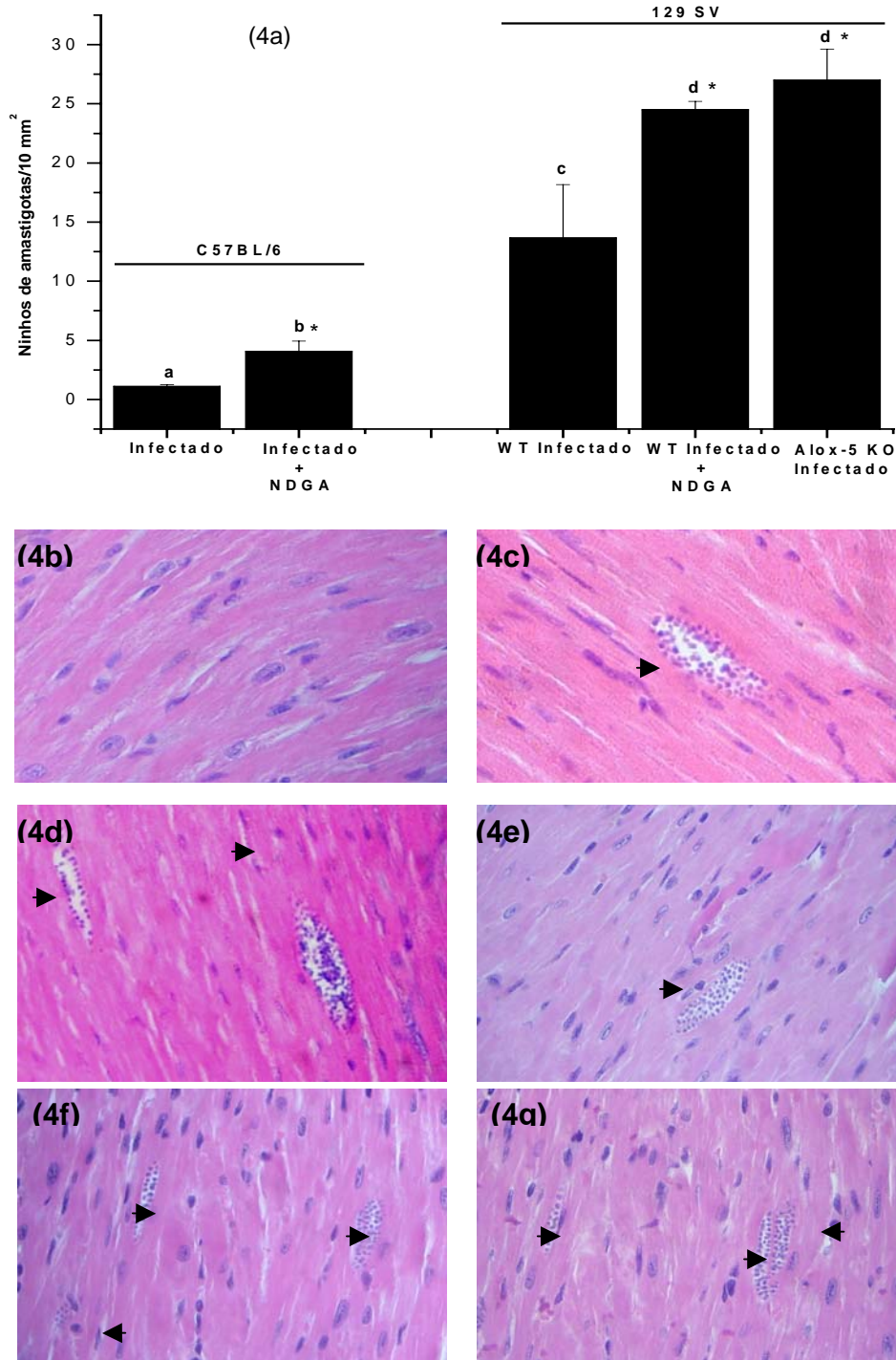


Figura 4 – Quantificação de ninhos de amastigotas de *T. cruzi* no miocárdio de camundongos C57BL/6 e 129 no 12º dia pós-infecção (4a). Os camundongos foram infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) por via intraperitoneal e tratados ou não com NDGA (50 mg/Kg) durante 12 dias. O tecido cardíaco dos camundongos C57BL/6 infectado e tratado com NDGA (4d) apresentou 4 vezes mais ninhos de parasitos que o tecido cardíaco dos camundongos C57BL/6 infectados e não tratados (4c) no 12º dia de infecção. O tecido cardíaco dos camundongos 129sv (WT) infectados e tratados com NDGA (4f) e camundongos 129 5-LO^{-/-} infectados (4g) ambos apresentaram significativamente mais ninhos de parasitos, quando comparados com o grupo 129sv (WT) infectado e não tratado (4e). * $p < 0,05$ (teste de Bonferroni). Aumento de 400x e coloração de H&E. As setas indicam os ninhos de amastigotas.

linhagem C57BL/6, o que corrobora os resultados mostrados na figura 3 com taxas de sobrevivência menor nos animais da linhagem 129.

4.2 O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA 5-LO REDUZ A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO) é comprovadamente um dos principais mediadores envolvidos no controle da infecção por *T. cruzi*. Nossos experimentos mostram que a inibição na produção de leucotrienos exacerba a infecção, com aumento da parasitemia e parasitismo cardíaco. Realizamos testes “in vitro” para determinar o efeito do bloqueio da 5-LO na produção de NO por macrófagos do exsudato peritoneal (PEC) e em células esplênicas (SC) (Figura 6).

O pré-tratamento com o inibidor da 5-LO, NDGA, reduziu significativamente ($p < 0,05$) em cerca de 20% a produção de NO pelos macrófagos de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS (Figura 6a). Similarmente, a produção de NO por macrófagos de camundongos 129 estimulados com LPS foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) em aproximadamente 30% pelo tratamento com NDGA (Figura 6b). Nos camundongos 129 com o gene para 5-LO depletado, a produção de NO não foi significativa após a estimulação com LPS, permanecendo no nível comparável ao animal não estimulado (figura 6b). Também a produção de NO por células esplênicas foi reduzida, significativamente ($p < 0,05$), em aproximadamente 30% pelo tratamento com NDGA nos camundongos C 57BL/6 (Figura 7).

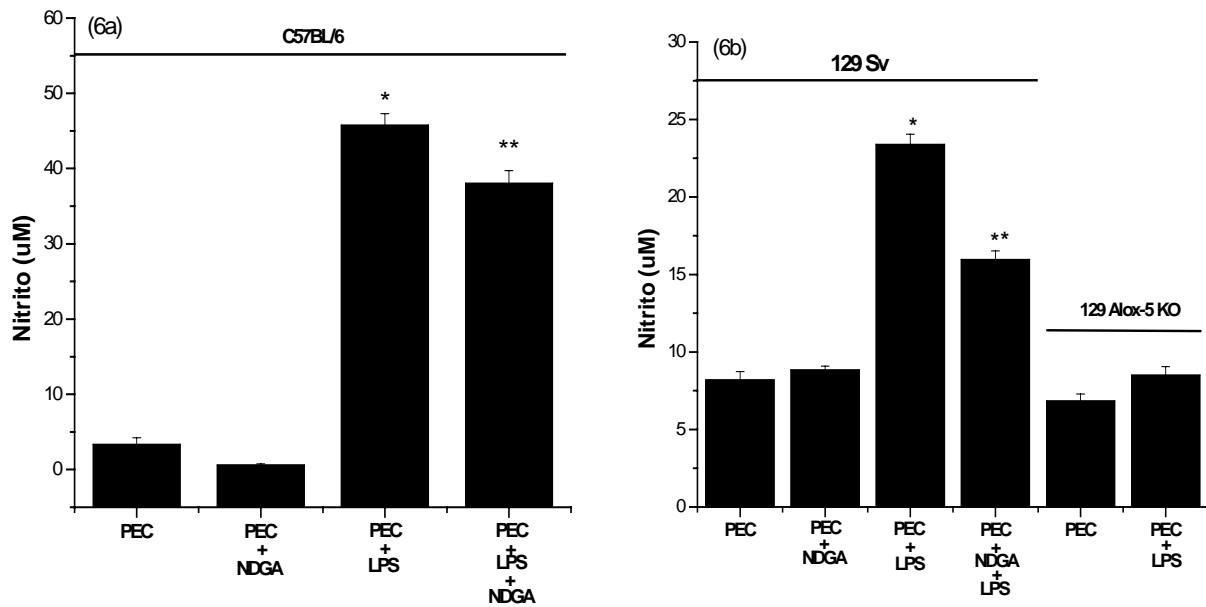


Figura 5 – Efeito do tratamento com inibidor da 5-lipoxigenase (5-LO), NDGA na produção de NO em células do exsudato peritoneal -PEC de camundongos C57BL/6 (6a) e 129 (6b). As PEC ($2,0 \times 10^5$ /cavidade) foram cultivadas por 24 horas em meio RPMI 1640 em câmara úmida em estufa contendo 5% CO_2 a 35°C , somente com o meio, meio + NDGA ($10\mu\text{M}$) (NDGA), $1\ \mu\text{g}$ de LPS (LPS) e LPS + NDGA (LPS+NDGA). Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de nitrito foram determinadas pela reação de Griess. Os resultados representam a média \pm SD de amostras em triplicata e são representativas de dois a cinco experimentos independentes. * Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com as células não estimuladas com LPS. ** Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com as células estimuladas com LPS e não tratadas com NDGA.

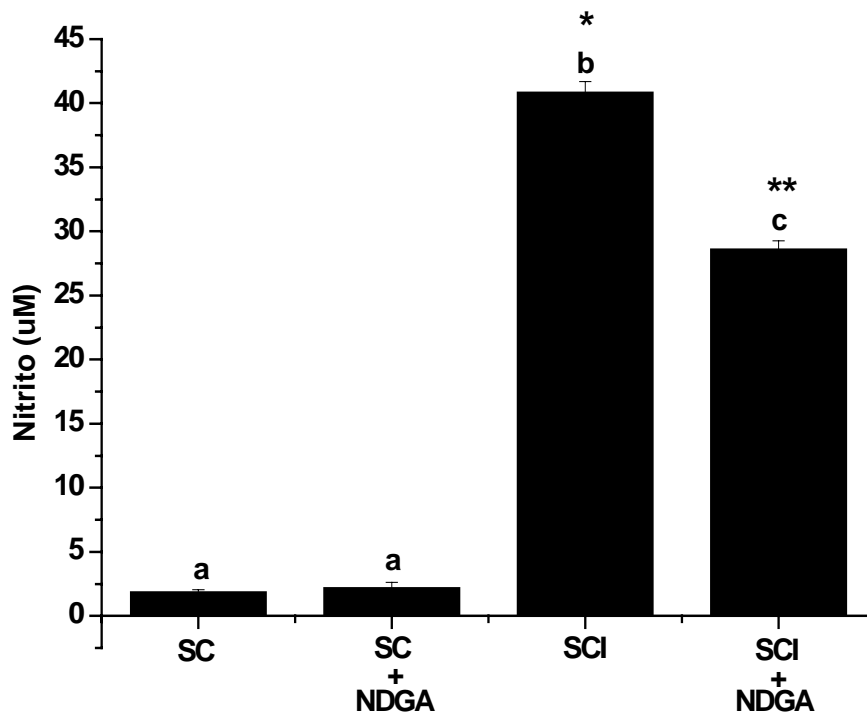


Figura 6 – Efeito do tratamento com inibidor da 5-lipoxigenase (5-LO), NDGA na produção de NO em células esplênicas (SC) de camundongos C57BL/6. SC de camundongos não infectados (SC) e infectados com 5×10^3 *T. cruzi* 12 dias pós infecção (SCI) na quantidade de $2,0 \times 10^5$ /cavidade, foram cultivadas por 48 horas em meio RPMI 1640 em câmara úmida em estufa contendo 5% CO_2 à 35°C , somente com o meio (SC ou SCI), meio + NDGA ($10 \mu\text{M}$) (NDGA). Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de nitrito foram determinadas pela reação de Griess. Os resultados representam a média \pm SD de amostras em triplicata e são representativas de três experimentos independentes. * Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com as células de camundongos não infectados ** Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com as células de camundongos infectados e não tratadas com NDGA.

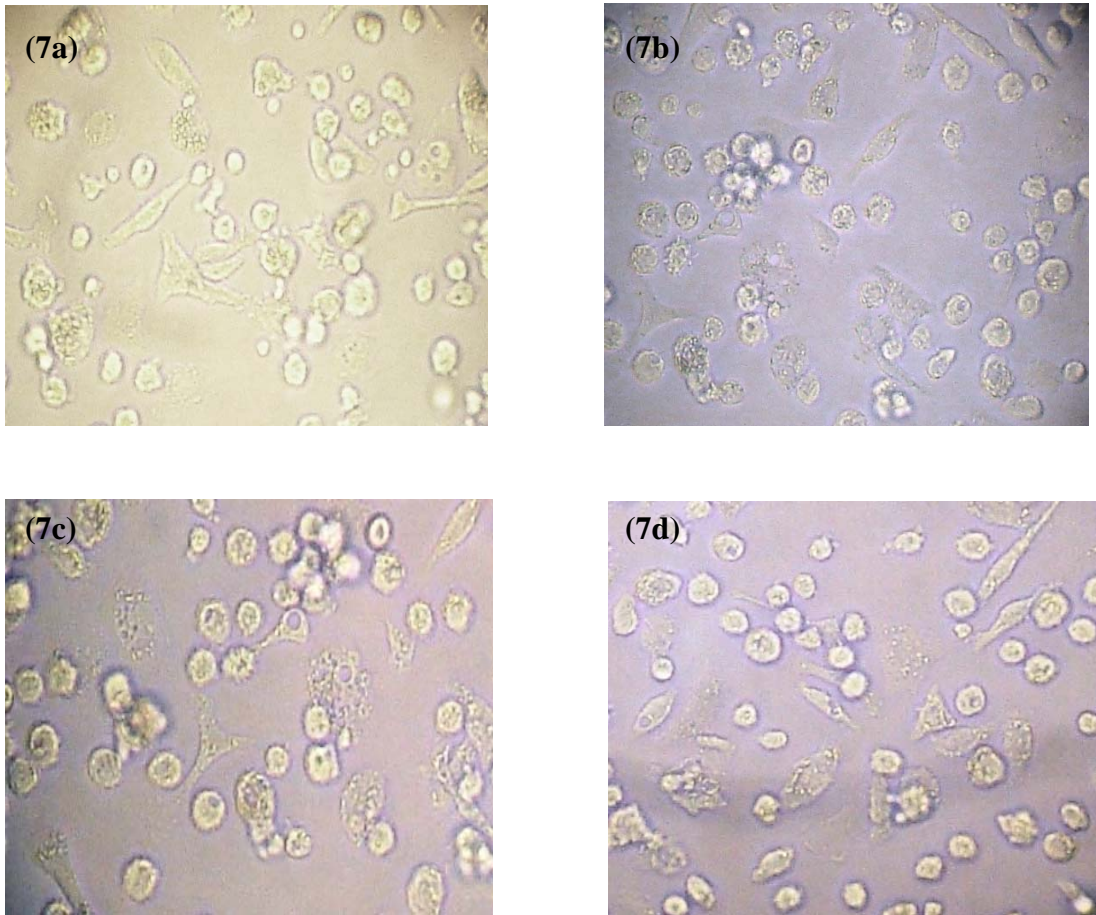


Figura 7 – Viabilidade das PEC após 24 horas de incubação..PEC de camundongos C57BL/6 ($2,0 \times 10^5$ /cavidade) cultivadas por 24 horas em meio RPMI 1640 em câmara úmida em estufa contendo 5% CO_2 a 35°C . (8a) PEC de camundongo normal; (8b) PEC de camundongo normal tratadas com NDGA $10 \mu\text{M}$; (8c); PEC de camundongo normal tratado com LPS; (8d) PEC de camundongo normal tratado com LPS e NDGA $10 \mu\text{M}$. Aumento de 400x.

A determinação da viabilidade celular, superior a 95%, ao final dos cultivos celulares, realizada com azul de Trypan demonstrou que o tratamento com NDGA na concentração de $10 \mu\text{M}$ não causou efeito tóxico nas células (Figura 8).

4.3 A 5-Lipoxigenase e óxido nítrico sintase induzível não estão envolvidas no processo gerador da anemia, trombocitopenia e hipoplasia medular durante a fase aguda da infecção com *T cruzi*.

Para avaliar a participação da 5-LO na geração da anemia na fase aguda da infecção, utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO, 129sv (WT) e 129 5-LO^{-/-} infectados com *T cruzi*, tratados ou não com NDGA. Os resultados são apresentados na tabela 1 e indicam a não participação da 5-LO na anemia durante a fase aguda da doença de chagas experimental.

Todos os grupos infectados apresentaram anemia (que foi mais intensa nos animais C57BL/6 em comparação com os animais da linhagem 129), trombocitopenia e leucopenia (Tabela 1) no 12º dia de infecção. A pancitopenia no sangue periférico foi acompanhada de redução do número de megacariócitos e células nucleadas na medula óssea (tabela 2).

A anemia desenvolvida nos camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO e 129sv (WT) não foi modificada pelo bloqueio na 5-Lipoxigenase dos animais com NDGA. Também os animais 129 5-LO^{-/-} apresentaram o mesmo perfil de anemia dos animais 129sv (WT) (selvagens).

Tabela 1 – Valores hematológicos de camundongos infectados com *T. cruzi* no 12º dia de infecção ^a

Grupos	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	Plaquetas (x10 ³ /μL)	Leucócitos (x10 ³ /μL)
C57BL/6				
C	14,2 ± 0,5	45,2 ± 1,1	914 ± 107	6,16 ± 0,61
C + NDGA	13,9 ± 0,2	44,0 ± 1,4	1024 ± 99	5,00 ± 0,69
I	9,3 ± 1,2*	29,2 ± 1,9*	224 ± 90*	2,16 ± 0,53*
I + NDGA	9,8 ± 0,9*	31,2 ± 1,5*	258 ± 61*	2,08 ± 0,38*
C57BL/6 iNOS KO				
C	14,9 ± 1,2	43,8 ± 2,6	1022 ± 111	5,74 ± 0,94
C + NDGA	14,8 ± 1,4	44,7 ± 2,5	950 ± 134	5,36 ± 1,18
I	11,5 ± 0,7*	34,6 ± 1,5*	80 ± 10*	1,84 ± 0,41*
I + NDGA	12,2 ± 1,1*	33,3 ± 2,1*	87 ± 7*	1,43 ± 0,25*
129 sv				
C	15,9 ± 0,32	46,7 ± 0,6	520 ± 82	7,0 ± 1,2
C + NDGA	15,6 ± 0,26	46,3 ± 1,2	647 ± 81	7,5 ± 0,5
I	12,3 ± 1,22*	36,7 ± 2,1*	122 ± 8*	2,8 ± 0,5*
I + NDGA	11,0 ± 1,06*	35,0 ± 1,0*	125 ± 7*	2,3 ± 0,2*
129 5-LO^{-/-}				
C	15,7 ± 0,10	47,0 ± 2,5	425 ± 7*	6,7 ± 1,9
I	12,8 ± 0,10*	36,0 ± 2,0*	112 ± 8*	3,0 ± 0,7*

^a Os grupos de camundongos foram infectados (I) com 5x10³ *T. cruzi* ou infectados e tratados com 50 mg/kg do ácido nordihidroguairético (NDGA); (C) controle; (C + NDGA) controle tratado com NDGA; (I) infectado; (I + NDGA) Infectado e tratado com NDGA. A análise hematológica foi processada como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média ± SD e são representativos de três experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. * Significativamente diferente (p<0,05) quando comparado com o grupo não infectado.

Tabela 2 – Células nucleadas da medula óssea de camundongos infectados com *T. cruzi* no 12º dia de infecção^b

Grupos	Células da Medula óssea (x10 ⁶ /camundongo)	Megacariócitos (x10 ³ /camundongo)
C57BL/6		
C	59,87 ± 4,17	49,00 ± 12,50
C + NDGA	54,26 ± 5,43	46,00 ± 8,95
I	25,58 ± 3,02*	17,00 ± 5,70*
I + NDGA	31,63 ± 3,03*#	16,75 ± 1,12*
C57BL/6 iNOS KO		
C	55,93 ± 8,55	70,00 ± 9,35
C + NDGA	47,15 ± 3,30	60,83 ± 6,29
I	5,48 ± 0,55*	3,00 ± 1,11*
I + NDGA	5,24 ± 0,81*	3,33 ± 1,14*
129 sv		
C	39,50 ± 7,00	33,30 ± 5,70
C + NDGA	42,60 ± 2,00	40,00 ± 10,00
I	17,90 ± 3,90*	5,00 ± 0,50*
I + NDGA	17,50 ± 4,60*	5,00 ± 0,90*
129 5-LO^{-/-}		
C	47,90 ± 7,00	35,00 ± 7,00
I	17,70 ± 1,90*	5,00 ± 0,70*

^bOs grupos de camundongos foram infectados (I) com 5x10³ *T. cruzi* ou infectados e tratados com 50 mg/kg do ácido nordihidroguairético (NDGA);(C) controle; (C + NDGA) controle tratado com NDGA; (I) infectado; (I + NDGA) Infectado e tratado com NDGA. A análise hematológica foi processada como descrito em materiais e métodos Os resultados representam a média ± SD e são representativos de três experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. * Significativamente diferente (p<0,05) quando comparado com o grupo não infectado. # Significativamente diferente (p<0,05) quando comparado com o grupo infectado.

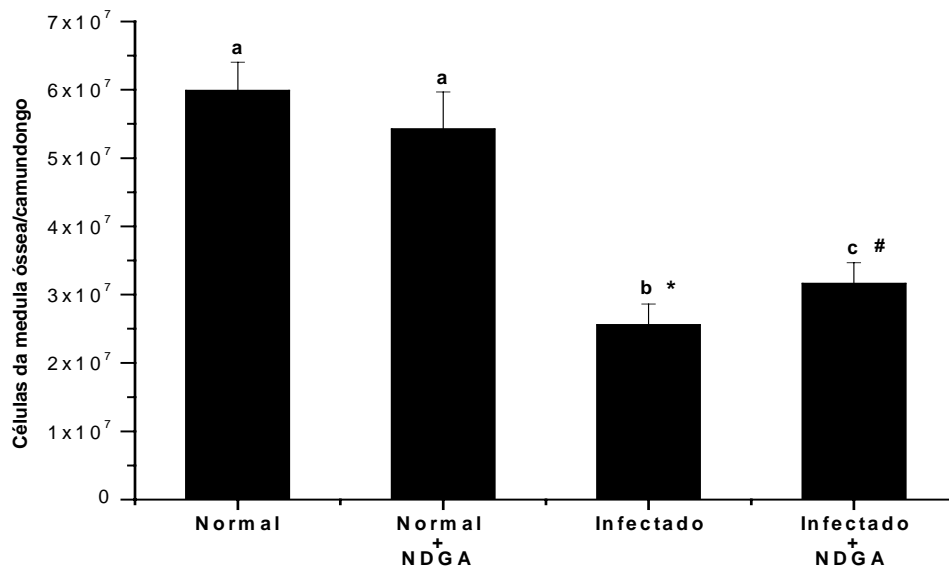


Figura 8 – Células da medula óssea de camundongos infectados com *T cruzi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 5.10^3 formas tripomastigotas de *T cruzi*. 4 horas após a infecção e diariamente, o grupo Infectado + NDGA recebeu 50 mg/Kg de NDGA via intraperitoneal, o mesmo tratamento recebido pelo grupo controle + NDGA. A análise hematológica foi processada como descrito em materiais e métodos Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. * Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo não infectado. # Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo infectado.

Nos animais C57BL/6 a diminuição na celularidade total da medula óssea foi parcialmente revertida pelo tratamento com NDGA (Figura 5), porém sem modificar os parâmetros no sangue periférico.

4.4 O BLOQUEIO DA 5-LO ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO COM *T CRUZI* DE MANEIRA DEPENDENTE DE NO

Para avaliar participação da 5-LO no estresse oxidativo que ocorre durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, determinamos o perfil de oxidação da hemoglobina e avaliamos a lipoperoxidação em eritrócitos de

camundongos tratados ou não com NDGA e camundongos nocautes para 5-LO.

Agentes oxidantes podem provocar a transformação da oxihemoglobina em metahemoglobina e hemicrômio. Particularmente o NO pode atravessar a membrana do eritrócito e reagir com grupamentos SH (BASKURT *et al.*, 1998) principalmente com grupamentos hemoglobina-cisteína, gerando S-nitroso-hemoglobina e nitrosil-hemoglobina (RASSAF *et al.*, 2003). A nitrosil-hemoglobina lentamente se converte em metehemoglobina (metHb), na presença de oxigênio (HAROLD & ROCK, 2003) Assim, a determinação da metahemoglobina pode ser útil como indicador de estresse oxidativo mediado pelo NO.

Nossos resultados mostram que a infecção por si só não foi capaz de provocar alterações no espectro de hemoglobina, o que sugere ausência de oxidação da hemoglobina (Figura 9) detectável na metodologia utilizada. Do mesmo modo o tratamento com NDGA não provocou alteração.

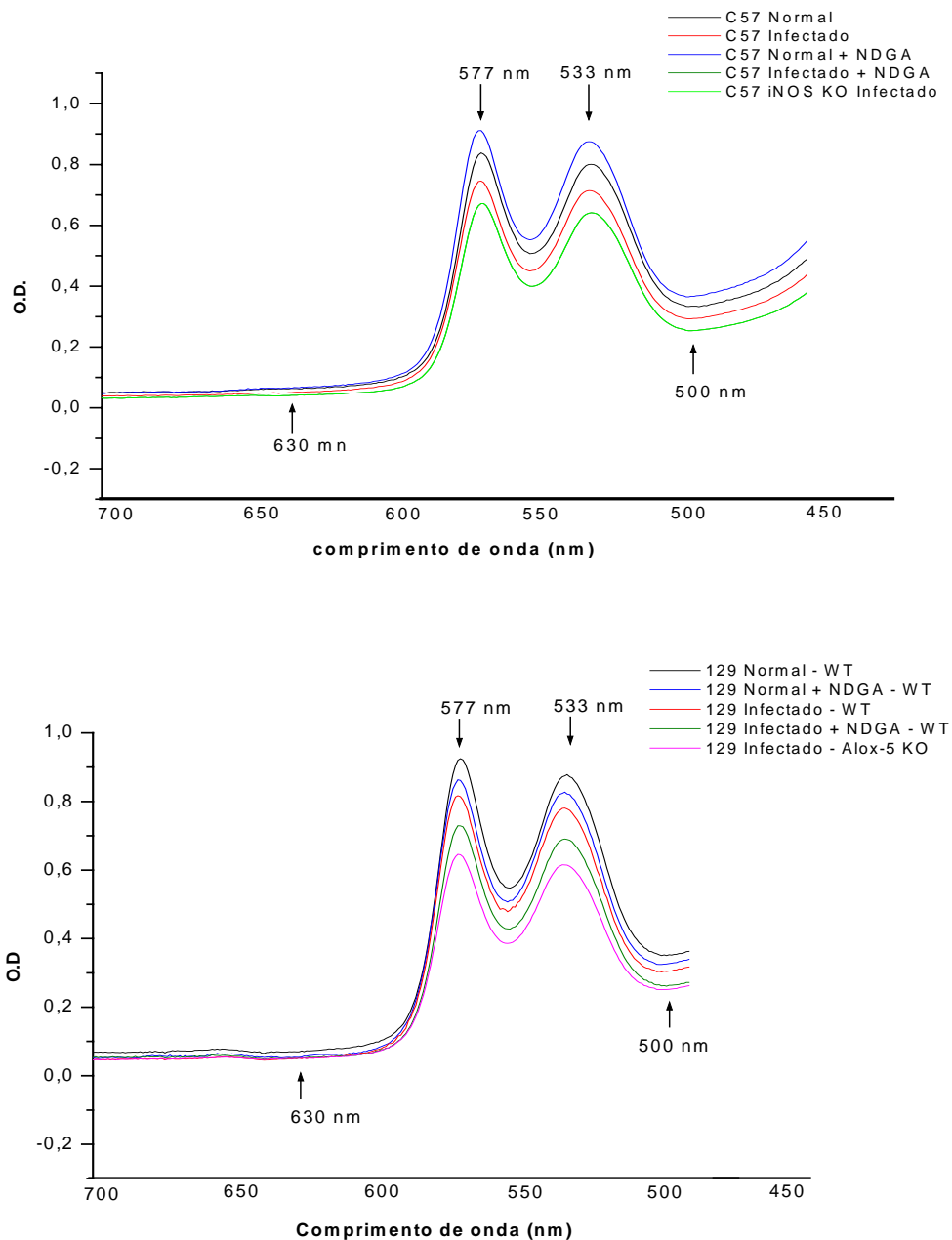


Figura 9 – Espectro de hemoglobina de eritrócitos de camundongos normais e infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T cruzi*. Os grupos de camundongos são: controle normal (**normal**); não infectado e tratado com NDGA (**normal+NDGA**); **infectado** com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T cruzi* (12 dias pós-infecção) e infectado e tratado com NDGA (**Infectado+NDGA**) 50 mg/Kg durante 12 dias. Os eritrócitos de cada grupo foram hemolisados em H_2O (O.D. 0,800-0,900) e o perfil de oxidação foi obtido por varredura espectral entre 700 e 450 nm. Os dados representam a média \pm SD e são representativos de três experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. Nenhuma alteração espectral (oxidação) foi observada.

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

O consumo de oxigênio pelos eritrócitos está associado com a susceptibilidade da membrana para sofrer peroxidação lipídica. Utilizando eletrodo tipo Clark para medir o consumo de oxigênio induzido pelo *tert*-butilhidoperóxido (*t*-BHP) em eritrócitos, constatamos um consumo de oxigênio significativamente maior ($p < 0,05$) pelos animais infectados com *T. cruzi* quando comparados com os animais normais (Figura 10).

Essa elevação no consumo de oxigênio foi abolida pelo tratamento com NDGA nos animais C57BL/6, ($50,8 \pm 2,7$ vs $40,4 \pm 3,0$ nMOL/mg de proteína) mas não nos camundongos C57BL/6 iNOS KO ($49,0 \pm 2,8$ vs $46,5 \pm 3,9$ nMOL/mg de proteína) (Figura 10a), indicando que a atenuação no estresse oxidativo induzida pelo NDGA é dependente de NO.

Nos animais da linhagem 129 a ausência do gene para 5-LO reduziu significativamente ($p < 0,05$) o consumo de oxigênio ($52,2 \pm 8,1$ nMOL/mg de proteína nos camundongos 129sv (WT) versus $40,0 \pm 5,7$ nMOL/mg de proteína nos camundongos 126 5-LO^{-/-}).

O tempo de indução, calculado a partir dos dados do oxímetro, está diretamente relacionados com a capacidade antioxidante intraeritrocitária. Durante a infecção pelo *T. cruzi* o tempo de indução foi significativamente menor nos camundongos infectados quando comparado aos grupos normais.

Aqui novamente, o tratamento com o inibidor de 5-LO, NDGA reverteu significativamente ($p < 0,05$) o estresse oxidativo induzido pela infecção nos camundongos C57BL/6 ($T^{ind} = 139,7 \pm 6,9s$ vs $171,3 \pm 8,3s$), mas não nos camundongos C57BL/6 iNOS KO ($T^{ind} = 145,0 \pm 14,0s$ vs $160,6 \pm 20,7s$) (Figura 10b) corroborando com os dados de consumo de oxigênio de que o efeito do bloqueio na produção de leucotrienos com NDGA na reversão do estresse está diretamente relacionado com a diminuição na concentração de NO.

Também nos animais da linhagem 129, a ausência do gene para 5-LO alterou significativamente o T^{ind} , ($199 \pm 17s$ nos animais 129sv (WT) versus $218 \pm 14s$ nos animais 129 5-LO^{-/-}).

4.4.2 Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos por quimioluminescência iniciada pelo *terc*-butil hidroperóxido

Altos picos de quimioluminescência estão associados a dano oxidativo prévio ao tecido. Analisando a cinética das curvas de quimioluminescência consideramos que o estresse oxidativo prévio dos eritrócitos, antes da adição do t-BHP está associado um tempo menor para atingir o pico de quimioluminescência, o que conseqüentemente, desloca o pico de QL para a esquerda (Figura 12).

No caso da lipoperoxidação nos eritrócitos durante a infecção pelo *T. cruzi* os picos são pouco elevados e a quimioluminescência é de baixa emissão. A figura 12 mostra o perfil das curvas de QL em eritrócitos de camundongos C57BL/6 durante a infecção com *T. cruzi*, com ou sem o tratamento com NDGA.

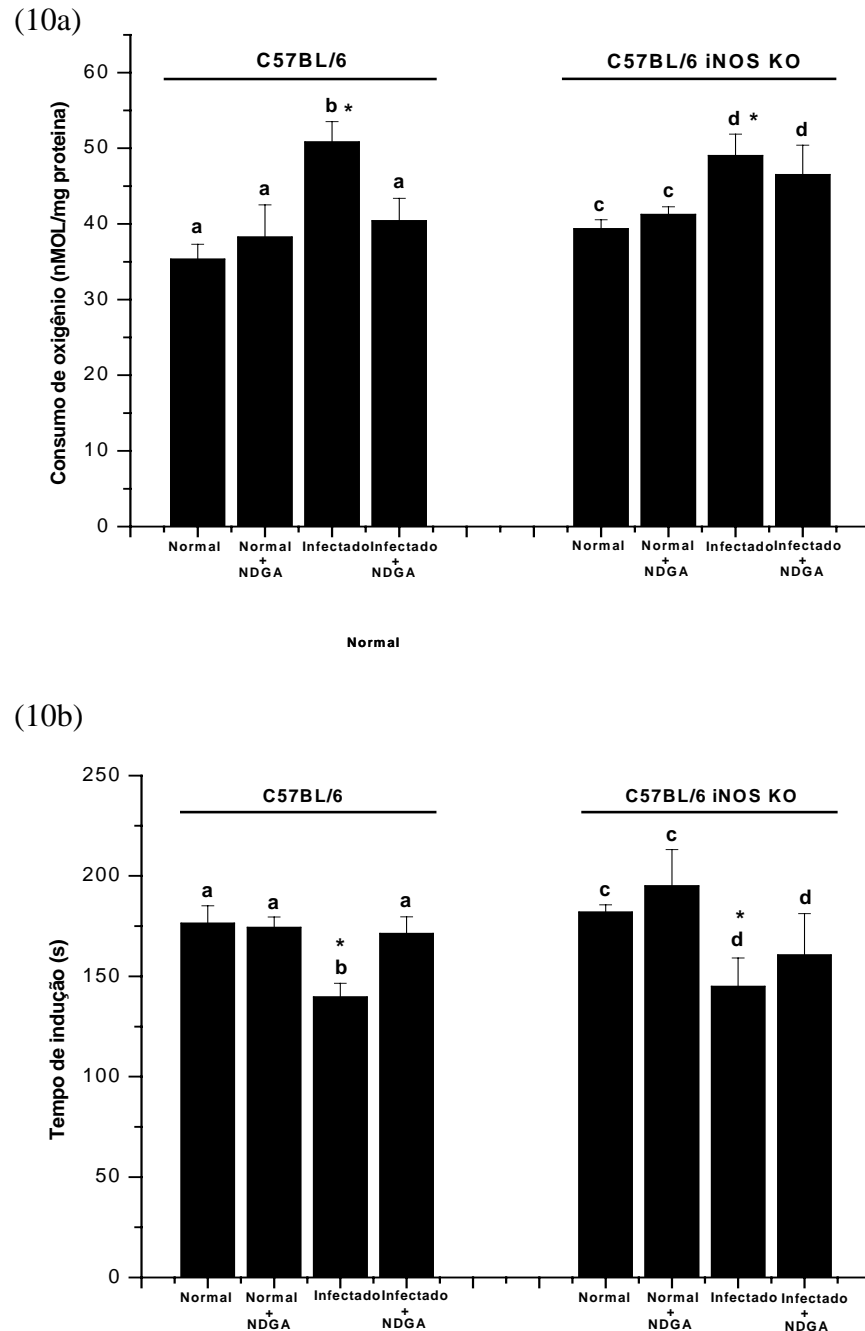


Figura 10 – Estresse oxidativo em eritrócitos durante a infecção por *T. cruzi*. Os gráficos mostram o consumo de oxigênio (10a) e tempo de indução - T^{ind} (10b) induzido pelo t-BHP em eritrócitos de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 iNOS KO normais e infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (12º dia de infecção), ou infectados e tratados diariamente com NDGA (50 mg/Kg) por via intraperitoneal 4 horas após a infecção e diariamente durante 12 dias. O consumo de oxigênio foi determinado em eletrodo de Clark como descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média \pm SD e são representativos de três experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. * Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo normal ou com o grupo infectado e tratado com NDGA.

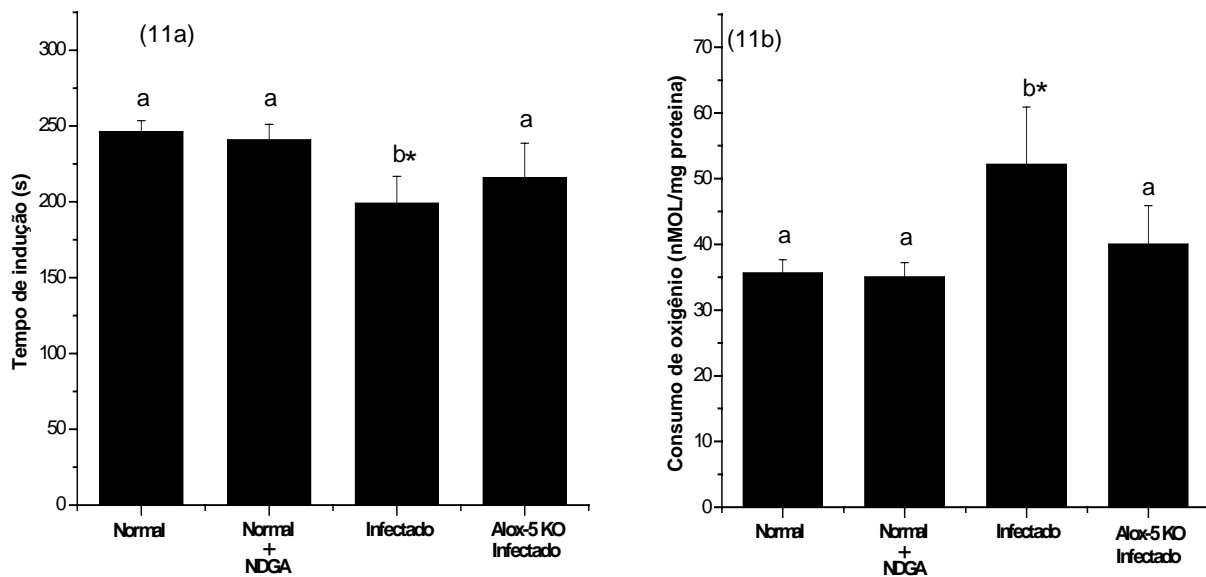


Figura 11 – Estresse oxidativo em eritrócitos durante a infecção por *T. cruzi*. Os gráficos mostram o tempo de indução - T^{ind} (11a) e o consumo de oxigênio (11b) induzido pelo t-BHP em eritrócitos de camundongos 129sv (WT) e 5-LO^{-/-} normais e infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (12º dia de infecção), ou normais e tratados diariamente com NDGA (50 mg/Kg) por via intraperitoneal 4 horas após a infecção e diariamente durante 12 dias. O consumo de oxigênio foi determinado em eletrodo de Clark e a partir dos dados do oxímetro foi calculado o tempo de indução como descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média \pm SD e são representativos de dois experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. * Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo normal.

Quando analisamos as curvas de QL iniciada pelo t-BHP nos camundongos infectados com *T. cruzi* (Figura 12A), verificamos um tempo menor para atingir o pico (Tabela 2), tanto nos camundongos C57BL/6, C57BL/6 iNOS KO, quanto nos camundongos 129sv (WT), quando comparado com os animais não infectados.

Nos animais C67BL/6 o bloqueio na 5-LO com NDGA reverte totalmente ($p < 0,001$) o estresse induzido pela infecção (Figura 13a), ao contrário do que acontece com o grupo C57BL/9 iNOS KO que não sofre nenhum efeito com o tratamento com NDGA (Figura 13b). Nos animais 129sv (WT) o tratamento com

NDGA reverte significativamente ($p < 0,05$) o estresse (Figura 13c), demonstrado por um tempo maior para atingir o pico de QL, comparado com o grupo infectado.

Também nos animais 129 geneticamente deficientes em 5-LO a infecção induz um estresse oxidativo menor, com um tempo maior para atingir o pico de QL, comparado com o grupo 129sv (WT) (selvagem) infectado.

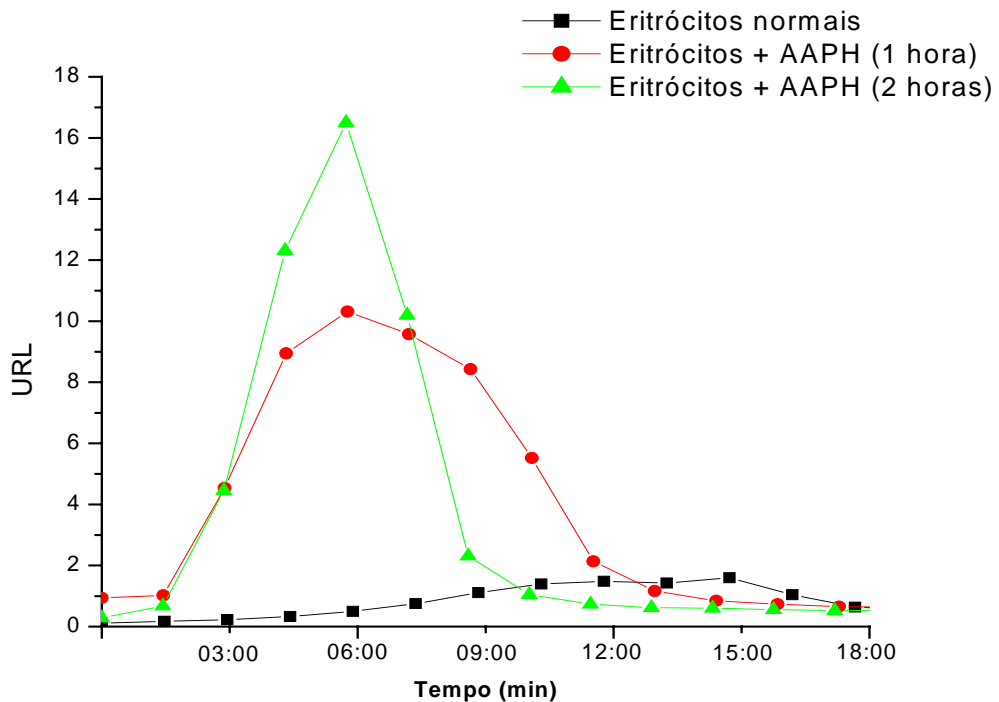


Figura 12 – Quimiluminescência iniciada por *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em eritrócitos de camundongos. Os grupos de eritrócitos são: grupo controle normal (**eritrócitos normais**); eritrócitos submetidos ao estresse oxidativo moderado pela incubação com AAPH 5 mM durante 1 hora (**eritrócitos + AAPH 1 hora**) e eritrócitos submetidos ao estresse oxidativo moderado pela incubação com AAPH 5 mM durante 2 horas (**eritrócitos + AAPH 2 horas**). As curvas representam a média de 5 determinações para cada grupo. AAPH: 2,2 Azobis (2-amidinopropano) hidrocloreto

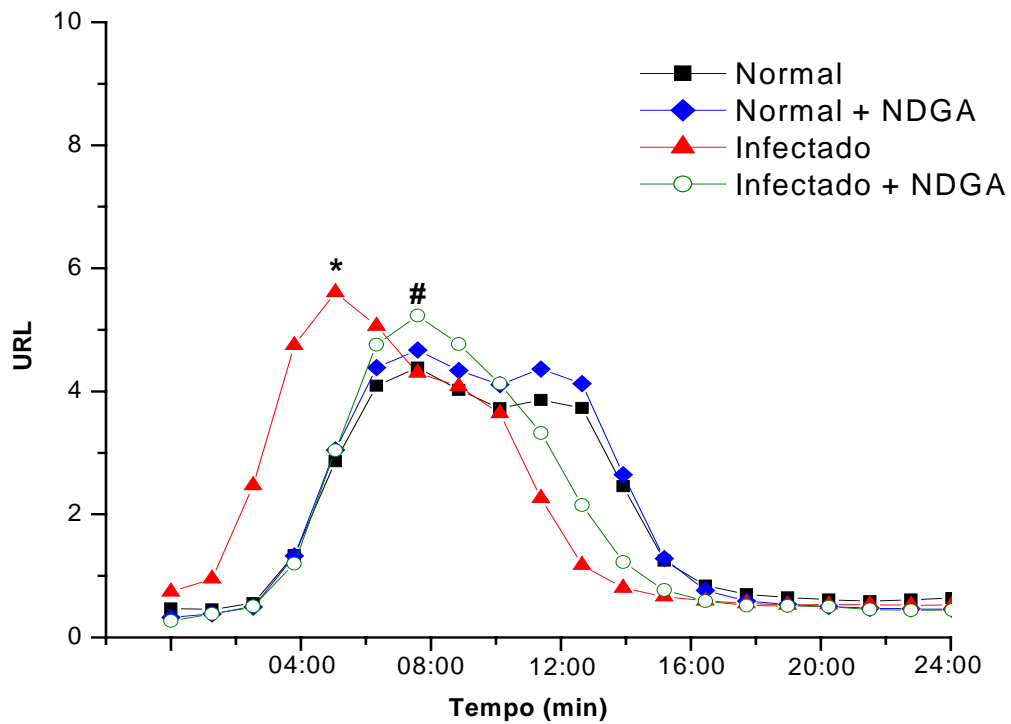


Figura 12A – Quiluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em eritrócitos. Os grupos de camundongos são: grupo controle normal (**normal**); controle não infectado e tratado com NDGA – 50 mg/Kg durante 12 dias (**normal+NDGA**); **infectado** com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (12 dias pós infecção) e infectado e tratado com NDGA (**Infectado+NDGA**) 50 mg/Kg durante 12 dias. A leitura de quiluminescência foi monitorada durante 20 minutos em luminômetro TD-20/20 (Turner Designs), com intervalo de detecção de 300 a 620 nm. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos utilizando 5 animais por grupo e foram comparados pelo teste de comparação de Tukey–Kramer e ANOVA. * $p < 0.05$ comparados com o controle. # $p < 0.05$ comparados com o grupo infectado.

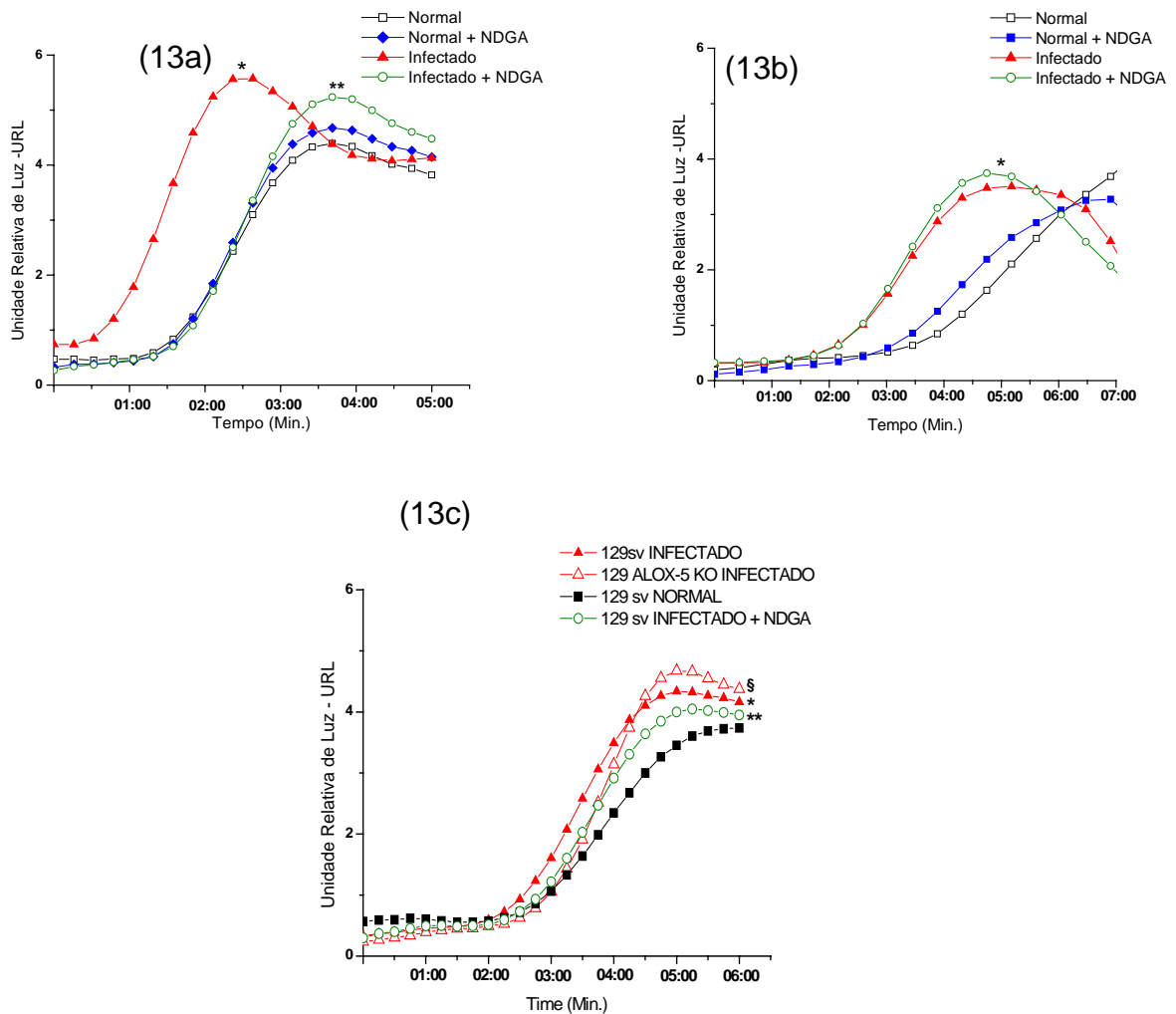


Figura 13 – Quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em eritrócitos. Os grupos de camundongos são: grupo controle normal (**normal**); controle não infectado e tratado com NDGA – 50 mg/Kg durante 12 dias (**normal+NDGA**); **infectado** com $5 \cdot 10^3$ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (12 dias pós infecção) e infectado e tratado com NDGA (**Infectado+NDGA**) 50 mg/Kg durante 12 dias. A leitura de quimioluminescência foi monitorada durante 20 minutos em luminômetro TD-20/20 (Turner Designs), com intervalo de detecção de 300 a 620 nm Os dados representam a média \pm SD e são representativos de três experimentos independentes utilizando 5 animais por grupo. *Significativamente diferente ($p < 0.05$) comparado com o grupo controle. **Significativamente diferente ($p < 0.05$) comparado com o grupo infectado. §Significativamente diferente comparado ao grupo 129sv (WT) infectado.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra pela primeira vez que a 5-Lipoxigenase (5-LO) exerce papel chave no controle da carga parasitária e no estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi* (Cepa Y).

A origem desta investigação repousa em resultados anteriores obtidos em nosso laboratório, que demonstraram a participação do óxido nítrico (NO) e do TNF- α no estresse oxidativo associado com a anemia que se desenvolve no início da infecção com *T. cruzi* (MALVEZI *et al*, 2004).

A produção de NO por macrófagos ativados com IFN- γ é o principal mecanismo efetor durante a infecção experimental com *T. cruzi*. (GAZZINELLI *et al*, 1992; BRENER & GAZZINELLI, 1997; MACHADO *et al*, 2000; VESPA, 1994). Em adição, moléculas com propriedades quimiotáticas, como o fator ativador de plaquetas (PAF), quimiocinas e leucotrienos também participam da cascata de eventos que levam à produção de NO e morte do parasito (ALIBERTI *et al*, 1999; TALVANI *et al*, 2002). Ao contrário, IL-10 e TGF- β parecem modular negativamente a produção de NO e morte do *T. cruzi* induzida por citocinas pró-inflamatórias (SILVA *et al*, 1991; SILVA *et al*, 1992).

Os leucotrienos (LTs) são produtos do metabolismo do ácido araquidônico e são descritos como capazes de induzir a ativação e o recrutamento de leucócitos em vários modelos de inflamação e doenças alérgicas (SAMUELSSON, 1983; LEWIS, 1990) (FERMOR *et al*, 2001; LEVY *et al*, 2001). Os Leucotrienos (LTB₄) agem via receptores acoplados à proteína G e são produzidos enzimaticamente por meio da 5-lipoxigenase (DIXON *et al*, 1990; DAHLEN *et al*, 1980).

Mais recentemente foi constatado que os LTs são essenciais para que ocorra uma eficiente resposta contra infecções por fungos porque eles modulam a produção de NO e de citocinas (MEDEIROS *et al.*, 2004). Os LTs não somente modulam as respostas inflamatórias, como também exercem diferentes papéis sobre as atividades de células fagocíticas, provocando o aumento da fagocitose, da atividade microbicida, geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, e de uma gama de citocinas (PETERS-GOLDEN, *et al.*, 2004). De fato, os efeitos de

LTB₄ sobre macrófagos e associação com a morte de *T. cruzi* foi descrito em dois estudos (WIRTH & KIERSZENBAUM, 1995 e TALVANI *et al.*, 2002).

Assim sendo, ficou claro para nós que a modulação das respostas inflamatórias e infecciosas por LTs poderiam de alguma forma participar no desenvolvimento do estresse oxidativo de eritrócitos associado com a anemia que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi*.

A fase aguda da infecção chagásica experimental desenvolvida em camundongos apresenta características similares à fase aguda humana. Nestes animais o curso da infecção varia amplamente com a raça, idade, via de inoculação e sexo do hospedeiro (GOBLE, 1951). Trischman e colaboradores (1978), trabalhando com diferentes linhagens de camundongos isogênicos, verificaram a existência de um padrão variável de suscetibilidade e de resistência à infecção chagásica. Mais tarde, este padrão de variação na susceptibilidade à doença de Chagas, foi confirmado em diferentes pesquisas realizadas tanto em humanos quanto em animais de laboratório e indicaram que essa variação pode ocorrer em parte devido a fatores genéticos (revisado por WILLIAMS-BLANGERO *et al.*, 2003). O curso da infecção pode também apresentar variações relacionadas ao parasito (cepa, inóculo, variação gênica e virulência) (ANDRADE, 1985; CORSINI, 1980 e MURFIN, 1989; MACEDO & PENA, 1998, RISSO *et al.*, 2004).

Tendo em vista o número de variáveis interferindo no desenvolvimento da infecção, o conceito de resistência e suscetibilidade é, portanto, relativo, visto que dependendo destes fatores, a infecção pode ser letal ou evoluir para a cronicidade (BRENER, 1982).

Com isso em mente, nós perguntamos se o bloqueio da 5-LO poderia influenciar a resistência de camundongos C57BL/6 infectados com doses não letais de formas tripomastigotas sanguícolas (5×10^3) de *T. cruzi* (Cepa Y). O bloqueio farmacológico da 5-LO com NDGA aumentou a carga parasitária no sangue e no coração dos camundongos C57BL/6 infectados, mas não modificou a porcentagem de sobrevivência e a anemia durante o período em que foi realizado o experimento. As linhagens resistentes freqüentemente controlam a parasitemia e sobrevivem à infecção aguda. É possível verificar que altas parasitemias não necessariamente provocam morte do animal e esse parece ser o caso da linhagem C57BL/6 utilizada. Em oposição, camundongos suscetíveis apresentam altas parasitemias na fase inicial da infecção com *T. cruzi*, esses geralmente não

ultrapassam a fase aguda da infecção, morrendo no período entre duas a três semanas após a inoculação dos parasitos.

Para confirmar a participação da 5-LO no controle da parasitemia na fase inicial da infecção, camundongos nocautes para a 5-LO e os seus respectivos controles selvagens (129sv (WT)) foram infectados com a mesma quantidade de formas tripomastigotas utilizadas nos experimentos realizados com os camundongos C57BL/6. Os camundongos 129sv (WT) do mesmo modo que os camundongos C57BL/6 apresentaram 100% de sobrevivência no período analisado, portanto, comportaram-se como camundongos resistentes ao inóculo de *T. cruzi* utilizado. Tanto os camundongos 129sv (WT) tratados com NDGA quanto os 129 5-LO^{-/-} (nocautes para 5-LO) apresentaram aumento da carga parasitária no sangue (9^o e 20^o dia de infecção para os 129Sv e 20^o dia de infecção para os camundongos 129 5-LO^{-/-}) e no coração (12^o dia de infecção) em relação aos respectivos controles. Todos os camundongos 129sv (WT) infectados e tratados com NDGA morreram até o 23^o dia pós-infecção enquanto que os camundongos 129 5-LO^{-/-} infectados morreram no 30^o dia pós-infecção, respectivamente. A análise do sangue destes animais revelou que os valores hematológicos não sofreram alterações importantes. Estes dados sugerem que a 5-LO exerce papel chave no controle da carga parasitária durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi*, e que o desenvolvimento da anemia nesta fase independe da presença da 5-LO. De fato, os leucotrienos parecem não atuar de maneira importante na recuperação da hematopoiese de camundongos (KOZUBIK *et al.*, 1993), embora eles sejam essenciais para a formação de células mielóides formadoras de colônias *in vitro* (VORE *et al.*, 1989).

LTB₄ e cysLTs induzem a produção de NO em neutrófilos humanos (SCHMIDT *et al.*, 1989; LARFARS *et al.*, 1999) e inibidores da 5-LO decrescem a formação de NO em macrófagos ativado (GOLDMAN *et al.*, 1993). Nossos dados mostram que o bloqueio da 5-LO com NDGA reduziu a produção de NO por macrófagos ativado com LPS. Isso pode explicar o aumento da carga parasitária observado no sangue e no coração dos camundongos tratados com NDGA e nocautes para 5-LO, já que há um número grande de evidências experimentais indicando que o NO produzido via óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é essencial para o controle da infecção com *T. cruzi* ((GAZZINELLI, 1992; VESPA, 1994).

Diversas evidências experimentais indicam que os eritrócitos são susceptíveis ao aumento de estresse oxidativo *in vivo* em diferentes parasitoses (BISWAS *et al.*, 1995).

O aumento do estresse oxidativo em eritrócitos está associado com a anemia que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi* (MALVEZI *et al.*, 2004). No nosso modelo de estudo, os eritrócitos não são diretamente parasitados e o estresse oxidativo sobre eles deve ter origem em sistemas geradores de radicais livres ou de precursores externos tais como o peróxido de hidrogênio.

Neste estudo nós avaliamos o estresse oxidativo que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi*, por meio da determinação do perfil de oxidação da hemoglobina, consumo de O₂ e tempo de indução. Em adição empregamos a técnica de quimiluminescência (QL) para avaliarmos a lipoperoxidação em eritrócitos obtidos de camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

A quimiluminescência estimulada por *tert*-butil hidroperóxido permite a análise da integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e dos níveis de lipoperoxídios de membrana existentes nos eritrócitos de camundongos infectados com *T. cruzi* (GONZALES-FLECHA *et al.*, 1991, OLIVEIRA & CECCHINI, 2000; TAGLIARI *et al.*, 2004).

Nossos dados não deixam dúvidas de que na fase inicial da infecção com *T. cruzi* ocorre um aumento a lipoperoxidação de eritrócitos. Mostramos que o bloqueio da 5-LO atenua a lipoperoxidação de eritrócitos no início da infecção com *T. cruzi* (12^o dia pós-infecção) de maneira dependente de NO. Em outro modelo de infecção parasitária, Serezani e colaboradores (2006) demonstraram que os leucotrienos são essenciais para o controle da infecção com *Leishmania* em um mecanismo também dependente de NO.

A produção de NO, induzida pelos LT, é mediada pelo TNF- α (TALVANI *et al.*, 2002), que é um fator inibidor da eritropoiese (MALVEZI *et al.*, 2004). Em nossos experimentos constatamos que a inibição da produção de LT diminuiu a produção de NO, mas não afetou a hipoplasia medular e não alterou o desenvolvimento da anemia, confirmando os dados de Malvezi e colaboradores de que a anemia durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* é independente do NO. Anjaneyulu e Chopra, 2004 demonstraram que o NDGA previne o estresse oxidativo em rim de camundongos com nefropatia diabética induzida pela estreptozotocina, porém sem demonstrar o mecanismo envolvido. Aqui, nós demonstramos

claramente que o estresse oxidativo em eritrócitos durante a fase aguda da infecção com *T cruzi* é completamente atenuado pelo bloqueio farmacológico, com NDGA, em camundongos C57BL/6, mas não em camundongos C57BL/6 iNOS KO, portanto, a ação do NDGA é dependente de NO.

Esses resultados foram confirmados pela utilização de camundongos geneticamente deficientes em 5-LO, que sofrem menos estresse que o tipo selvagem. O tratamento com NDGA no tipo selvagem também atenua o estresse de maneira semelhante à depleção do gene para 5-LO.

Tanto a infecção quanto à ausência de 5-LO (devido ao bloqueio farmacológico com NDGA ou genético por meio dos camundongos nocautes) (129 5-LO^{-/-}) não provocaram alterações significativas no espectro da hemoglobina (oxidação).

6 CONCLUSÕES FINAIS

- 1 5-LO exerce papel chave no controle da carga parasitária durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi*, e o desenvolvimento da anemia nesta fase independe da presença da 5-LO.
- 2 Nossos dados mostram que o bloqueio da 5-LO com NDGA reduziu a produção de NO por macrófagos ativados com LPS.
- 3 Na fase inicial da infecção com *T. cruzi* ocorre um aumento da lipoperoxidação de eritrócitos. O bloqueio da 5-LO atenua a lipoperoxidação de eritrócitos no início da infecção com *T. cruzi* (12^o dia pós-infecção) de maneira dependente de NO.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R. L. Cytokines and Nitric Oxide regulation of the immunosuppression in *T. cruzi* Infection. **J Immunol.** 155: 3955-3963, 1995.

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *T. cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, 84:231-244, 1996.

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

ALIBERTI, J.S.C.; MACHADO, F.S.; GAZZINELLI, R.T.; TEIXEIRA, M.M. SILVA, J.S. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi* – infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. **Infect. Immun.** 67: 2810-2814, 1999.

ALIBERTI, J.S.C.; MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P. TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in urine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 67: 4819-4829, 1999.

ANDERSON, W.E., ALISSON, R.D.; MEISTER, A. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified γ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D₄ and γ -glutamyl amino acids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 79: 1088, 1982.

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. The *T. cruzi* -host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol.** 2005.

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

ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M.; ANDRADE, S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *T. cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 18: 499-506, 1985.

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.

ANDREWS, N.W. Living dangerously: how *T. cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.** 26: 65-67, 1993.

ANJANEYULU, M. ; CHOPRA, K. Nordyhydroguaiaretic acid, a Lignin, Prevents Oxidative Stress and the Development of diabetic nephropathy in Rats. **Pharmacology** 72:42-50, 2004.

ANONIMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 suppl 1: 429-432, 1999.

ARAUJO-JORGE, E.T. Modelos animais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos (O Camundongo) . In: **Doença de Chagas: manual para experimentação animal**, Tânia C. de Araújo-Jorge Solange Lisboa de Castro (Org) Rio de Janeiro: Fiocruz- Instituto Oswaldo Cruz, 2000.

ARTEAGA, S.: ANDRADE-CETTO, A.; CÁRDENAS, R. *Larrea tridentata* (Creosote bush), na abundant planto f Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. **J. Ethnopharmacol.** 98: 231-239, 2005

BABIOR, B.M.; Superoxide: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**30 (2):141-155, 1997.

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.

BIRKENFELD, S.; ZALTSMAN, Y. ; KRISPIN, M. Antitumor effects of Inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors. **Diseases of the colon and return** 30: 43-46, 1987.

BISWAS, T.; PAL, J.K.; NASKAR, KHUDIRAN, GHOSH, D.K. ; GHOSAL J. Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Mol Cell Biochem.**146: 99-105, 1995.

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

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

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

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

CAMPOS, M.A; CLOSEL, M.; VALENTE, E.P.; CARDOSO, J.E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; ROPERT, C. ; GAZZINELLI, R.T. Impaired production fo proinflammatory cytokines and host rresistance to acute infection with *T.cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J. Immunol.** 172(3): 1711-8, 2004.

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

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

CARTER, BZ.; S.H.I, Z. BARRIOS R.; LIEBERMANN, M.W. Gamma glutamylLeukotrienase, a γ -glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in the spleen. **J. Biol. Chem.**,273:28277, 1998.

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..

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

CHEN, X-S.: SHELTER, J.R.; JOHNSON, E. N. ; FUNK, C. D. Role of Leukotrienes revealed by targeted disruption of 5-lipoxygenase gene. **Nature** 372:179-182, 1994.

- CORSINI, A.C. ; COSTA,M.; OLIVEIRA, L.P.; CAMARGO, J.B.; RANGEL,HA Fraction (Fad) from *T. cruzi* epimastigotes depress the immuneresponse in mice. **Immunol.** 40: 405, 1980.
- COSTA, V.M. TORRES,K.C.; MENDONÇA,R,C;; GRESSER,I.; GOLLOB,K,J;; ABRAHAMSOHN,I.A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. immunol.**177(5): 3193-3200, 2006.
- COSTA, F., FRANCHIN, G., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., RIBEIRÃO, M.; CHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *T. cruzi* infection in mice. **Vaccine**, 16: 768-774, 1998.
- DACIE, J.U.; LEWIS, S.M., **Hematologia Prática**, Ediciones Toray, S. A. Barcelona, 1975.
- DAHLEN, S.E.; HEDQVIST, P.; HAMMARSTROM, S. ; SAMUELSSON,B. Leukotrienes are potent constrictor of human bronchi. **Nature** 288: 484, 1980.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *T. cruzi*. **Int. Review Cytology**, 86:197-283, 1984.
- DIAS, J.C.P. Mecanismos de transmissão. In BRENER, Z. ; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 4, p. 152-174, 1979.
- DIAS, J.C.P. História natural da doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.**, 65:359-66, 1995.
- DIAZ, B.L. ; ARM, J.P. Phospholipase A₂. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, 69:87, 2003.
- DIXON, R.A .; DIEHL, R.E.; OPAS, E.; RANDS, E.; VICKRES, P.J. EVANS, J.F.; GILLARD, J.V. ; MILLER D.K. Requirement of a 5-lipoxygenase activating protein of leukotrienes biosynthesis. **Nature** 343: 282, 1990.
- 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 *T. cruzi* infection. **Parasitol Today**. 13(9):335-42, 1997.

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

EARASHI, M. Effects of eicosanoids synthesis inhibition on the in vitro growth and prostaglandin E and Leukotriene B secretion of a human breast cancer cell line. **Oncology** 52: 150-155, 1995.

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

FERMOR, B.; HARIBABU, B.; WEINBERG, J.B.; PISETSKY, B.S. ; GUILAK, F. Mechanical stress and nitric oxide influence leukotrienes production in cartilage. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 285: 806-810, 2001.

FRIDOVICH, I. Superóxide radical and superoxide dismutases. **An. Rev. Biochem**.64:97-112;1995.

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

GARG, N; POPOV, V.L.; PAPAConstantinou, J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *T. cruzi* infected murine hearts; implications chagasic myocarditis developments. **Biochim. Biophys. Acta** 1638: 106-120; 2003.

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

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

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

GIDDINGS, O .K.: EICKHOF, C.S. BRYANT, L.A. ; HOFT, D.F. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *T. cruzi* conjunctival infection. **Infect Immun.** 74(10):5549-60, 2006.

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.

GOBLE, F.C. Studies on experimental Chaga's disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. **J. Parasitol.**, 37:408- , 1951.

GOLDMAN, G.; WELBOURN, R. KOBZYK, L. VALERI, C.R.; SHEPRO, D. ; HECHTMAN, H.B. Lavage with leukotriene B₄ induces lung generation of tumor necrosis factor α that in turn mediates Neutrophil diapedesis. **Surgery** 113: 297, 1993.

GONZALES, M. ; BOWDEN, G. Nordihydroguaiaretic acid-mediated inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 activation in human keratinocytes. **Mol. Carcinogen.** 34: 102-111, 2002.

GONZALEZ-FLECHA, B. ; LLESURY, S ; BOVERIS, A . Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med.** 10(2):93-100, 1991.

GOSSELIN, J; BERGEAT P.; FLAMAND, L. Leukotriene B₄ Protects Latently Infected Mice against Murine Cytomegalovirus Reactivation following Allogeneic Transplantation. **J Immunol.**, 174:1587-1593, 2005.

GUTTERIDGE, E. E.; COVER, B.; DVABORAK, M. Jax inbred mice In chemotherapeutic investigations of experimental Chaga disease. **Ann. Trop. Med. Paras.** 72: 329-334 1978.

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.

HEROLD, S. ; ROCK, G. Reactions of deoxy-Oxy-, and Methaemoglobin with Nitrogen Monoxide. **J. Biol. Chem.** 278: 6623/6634, 2003.

HIGUSHI, M.L., GUTIERREZ, P.S., AIELLO, V.D., PALOMINO, S., BOCHI, E., KALIL, J., BELLOTTI, G. ; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic myocarditis: Comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.*, 423:157-60, 1993.

HOFF, R. Killing *in vitro* *T. 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.

HUNTER, C.A.; ELLIS-NEYES, L.A.; SLIFFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D. ; ARAUJO, F.G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 158(7):3311-6, 1997.

HYDER, P., FREDRICKSON, E.L.; RICK, E.; ESTELL, R.; TELLES, W.; GIBBENS, R. Distribution and concentration of total phenolic, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). **Biochem. Sistem. Ecology** 30:905-912, 2002.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-NONES, C.L. ; MACCURLLEY, T.L. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg.** 48(3):348-57, 1993.

JONES, S. **Sistemática vegetal**. México, Mc Graw-Hill, p 405-406, 1987.

KANAOKA, Y. ; BOYCE, J. A. Cysteinil leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. **J. immunol.**, 173:1503-1510, 2004.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends Parasitol.**21(11):513-516,2005.

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

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-Dependent Induction of IFN-beta Mediates Host Defense against *T. cruzi* . **J.Immunol.** 177(10):7059-66,2006.

KOZUBIK, A.; HOFMANOVA, J.; HOLA, J. ; NETIKOVA, J. The effect of nordihydroguaiaretic acid, na inhibitor of prostaglandins and leukotrienes biosynthesis, on hematopoiesis of gamma irradiated mice. **Exp. Hematol.** 21(1): 138-42, 1993.

LAGUENS, R. P., MECKERT, P. C., BASOMBRIO, M. A., CHAMBO, G. J., COSSIO, P.M. ARANA, R.M. ; GELPI, R. Infección crónica del ratón com *T. cruzi* . Modelo experimental de enfermedad de Chagas. **Medicina**, 40:33-9, 1980.

LARFARS, G.; LANTOINE, F.; DEVYNCH, M. A. ; PALMBLAD, J. ; GYLLEMHAMMAR, H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B₄, C₄ and D₄ in human polymorphonuclear leukocytes. **Blood** 93:1399, 1999.

LEE, C. W., LEWIS, R. A., COREY, E. J. ; AUSTEN, K. F. Conversion of leukotriene D₄ to leukotriene E₄ by a dipeptidase realized from the specific granules of human polymorphonuclear leukocytes. **Immunology**, 48:27, 1983.

LEVY, B.D.; CLISH, C.B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K. ; SERHAN, C.N. lipid Mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution **Nat. Immunol.** 7: 612-619, 2001.

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. ; SOBERMAN, R.J. Leukotrienes and other products of the 5_lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease. **N. Engl. J. Med.**323:645, 1990.

LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS E.S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *T. cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J. Exp. Med.**168:649-659;1988.

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.

LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. ; RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**:193: 265-75, 1951.

MAÇAO, L.B.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C.; PEREIRA, A.; BACKES, P.; TORRES, M.A.; FRÖDE, T.L. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **Int J Card.**2007
doi:10.1016/j.ijcard.2006.11.118

MACEDO, A.M. ; PENA, S.D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi* Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**.14 (3):119-24, 1998.

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

MACHADO, A.V.; CARDOSO, J.E.; CLASER, C.; RODRIGUES, M.M.; GAZZINELLI, R.T. ; BRUNA-ROMERO, O. Long-term protective immunity induced against *T. cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum Gene Ther.** 17(9):898-908, 2006.

MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A; ALIBERTI, J.C.S.; MESTRINER, F.L.A.; CUNHA, FQ. ; SILVA, J.S. *T. cruzi* -infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent typanocidal activity. **Circulation** 102: 3003-3008, 2000.

MACHADO, E.R.; UETA. M.; LOURENÇO. E.V.; ANIBAL, F.F.; SORGI, C.A.; SOARES, E.G.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MEDEIROS, A.; FACCIOLI, L. Leukotrienes Play a Role in the Control of Parasite Burden in Murine Strongyloidiasis. **J. Immunol.**175: 3892-3899, 2005.

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 *T. cruzi* infection. **FEMS Immunol. Med. Microb.**41:69-77;2004.

MALVEZI, A. D.; PERON, J. P. S.; MOURA, T. R.; SOUZA, F.; PINGE FILHO, P. Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss e C57BL/6 mantidos em biotério convencional. **Biosaúde** 2: 65-74, 2000.

MANCUSO, P.; NANA-SINKAM, P. ; PETERS-GOLDEN, M. Leukotriene B4 Augments Neutrophil Phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.** 69:2011-2016, 2001.

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

MEDEIROS, A.I.; SA-NUNES, A.; SOARES, E.G.; PERES, C.M.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Blockade of Endogenous Leukotrienes Exacerbates Pulmonary Histoplasmosis. **Infect. Immun.** 72:1637-1644, 2004.

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

MILLER, G.L. Protein determination of larger number of samples. **An. Chem:** 31, 964, 1959.

MINOPRIO, P. BANDEIRS, A.; PEREIRA, P.; MOTA-SANTO, T. A.; COUTINHO, A. Preferential expansion of Ly1-B and CD4-Cd8-T cell in the polyclonal lymphocyte response to murine *T. cruzi* infection. **Int. Immunol.**1: 176-184,1989.

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

MURFIN, D.J ; CHOROMANSKI, L.; JUN R.E. Relationship of route of infection to susceptibility and immune response of inbred mice to Y strain *T. cruzi* . Am. **J Trop Med Hyg.** 41(1): 41-9, 1989.

NATHAN, C.; NOGUEIRA, N.; JUANGLHANICH, C. ; ELLIS, J. ; COHN, Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *T. cruzi* . **J. Exp. Med.**149:1056-1068, 1979.

NICHOLSON, D. W.; ALI, A.; VAILLANCOURT, J. P.; CALAYCAY, J. R. MUNFORD, A.; ZAMBONI, R.J. ; FORD-HUTCHINSON, W. Purification to homogeneity and the N-terminal sequence of human leukotriene C4 synthase: a homodimeric glutathione S-transferase composed of 18-kDa subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90:2015, 1993.

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

OLIVEIRA, T.B.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. **Int J Card.** 2006.
doi:10.1016/j.ijcard.2006.04.046

OLIVEIRA, F.J. ; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. **J Parasitol.** 86 (5):1067-72, 2000

PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 158, 348-352, 1989.

PARAMESWARAN, K., LIANG, H., FANAT, A., WATSON, R., SNIDER, D.P.; MO.B.P. Role of cysteinil leukotrienes in allergen-induced change incirculating dendritic cell number in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.** 114:73, 2004.

PEREIRA, M. A. .; Cell Biology of *T. cruzi* In: **Modern Parasite. Biology; Cellular, Immunological, and Moleccular Aspects.** Wiler, D. J. ed. W. H. Freeman Company. N. Y.- 64-78,1990.

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P. ; COFFEY, M. J. Leukotriene: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. **J. Immunol.** 173:589-594,2004.

PINGE-FILHO, P.; PERON,J.P.S.; MOURA,T.R. ;MENOLLI,R.A; GRAÇA,V.K.; ESTEVÃO, D.; TADAKORO, C .E.; JANKEVICIUS, J. V.; RIZZO, L. V. Protective immunityagainst *T. cruzi* provided by oral immunization with *Phytomoas serpens*: role of nitric oxide. **Imunol Letters** 96:283-290, 2005.

PINGE-FILHO, P. **Aspectos imunohistológicos das placas de Peyer de camundongos normais e infectados com *T. cruzi*** . Campinas - São Paulo, 1993 [Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas].

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

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

POSTAN, M.; DEVORAC, J. A.; MCDANIEL, J. P. Studies of *T. cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEM- mice with two clones isolated from a common source. **Am J Trop Med Hyg.** 32: 497-506, 1983.

RASSAF, T.; BRYAN, N.S.; MALONEY, R.E.; SPECIAEAN, V.; KELM, M.; KALYANARAMN, B.; RODRIGUES, J.; FEELISCH, M. NO adducts in mammalian red blood cells: too much or too little. **Nat. Med.** 9: 481-483. 2003.

REED, S.G., INVERSO, J. A.; ROTERS, S. B.; Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic *T. cruzi* infection are restored with interleukin-2. **J. Immunol.** 133: 3333-3337, 1984.

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

RISSO, M. G.; GARBARINO, G. B.; MOCETTI, E.; CAMPETELLA, O.; GANZÁLEZ-CAPA, S.M.; BUSCAGLIA, C.A.; LEGUIZAMON, M.S. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *T. cruzi* phylogenetic lineages. **J Infect Dis.** 189(12): 2250-9, 2004.

ROBBIANI, D., FINCH, R. JAGER, D., MULLER, W., SARTORELLI, A.; RANDOLPH, G. The leukotriene C₄ transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3 β , ELC)-dependent mobilization dendritic cells to lymph nodes. **Cell**, 103:757,2000.

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 erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60 and HEL cells. **Exp. Hematol.** 15:928; 1987.

ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *T. cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.**, 61: 5129-5133, 1993.

- ROUZER, C.A.; MATSUMOTO, T. ; SAMUELSSON B. Single protein from human leukocytes processes 5-pipoxigenase and leukotriene A₄ synthase activities. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83:857, 1986
- SALARI, H.; BRAQUET, P. ; BERGEAT, P. Comparative effects of indomethacin, acetylenic acid, 15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW755C on the metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets. **Prostaglandin Leuk Med** 13: 53-60,1984.
- SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science** 220: 568-575, 1983.
- SANTOS-BUCH, C.A. ; TEIXEIRA, A.R.L. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. **J. Exp. Med.**, 140:38-52, 1974.
- SCHANAIDER, A. Radicais livres: 'vilões' ainda em estudo. **Ciência Hoje**, 158: 60-62. 2000.
- SCHMIDT, H.H.; SEIFFER, R. ; BOHME, E. Formation and release of nitric oxide from human Neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotrienes B₄. **FEBS Lett.** 244: 357,1989
- SCHOFIELD, D.B ; DIAS, J.C. The southern Cone Initiative against Chagas Disease. **Adv. Parasitol** 42: 1-27. 1999.
- SEREZANI, C.H. PERRELA, J.H.; RUSSO M.; PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S. Leucotrienes Are Essential for the Control of *Leishmania amazonensis* Infection and Contribute to Strain Variation in Susceptibility. **J. Immunol.** 177:3201-3208, 2006.
- SILVA, J.S.; TWARCZIK, D.R. ; REED, S.G. Regulation of *T. cruzi* infection in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-Beta). **J. Exp. Med.** 74: 529-545, 1991.
- SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D. ; REED, S.G. Interleukin 10 and Interferon gamma regulation of experimental *T. cruzi* Infection. **J. Exp. Méd.** 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.

SOARES, M. B. P.; DE CARVALHO, L. P.; DOS SANTOS R. R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet **An. Acad. Bras. Cienc.**; 73: 547-559, 2001.

SORIANO, A.; HELFRISCH, B.; CHAN, D.; HEASLEY, L.; BUNN, P.; CHOU, T. Synergic effects of new chemoprotective agents against human lung cancer cell lines. **Cancer Research** 59: 6178-6184, 1999.

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

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

TADOKORO, C.E and ABRAHAMSHON, I. A. (2001) Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens **Immunol Lett.** 77, 31-38, 2001.

TAGER A. M.; LUSTER, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors. **Prostaglandins Leukot. Fatty Acids**, 69:99:2003.

TAGER, A. M., BROMLEY, S.K., MEDOFF, B.D., ISLAM, S.A. BERCURY, S.D. FRIEDRICH, E.B., CARAFONE, A.D., GERSZTEN, R.D.; LUSTER A.D. Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nat. Immunol.**, 4:982, 2003.

TAGLIARI, K.C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J.A.; VARGAS, V.M. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutat Res.** 561(1-2):101-17, 2004.

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

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

TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity. **Trends Parasitol.**19(10):447-451,2003.

TARLETON, R. L. The role of T Cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol.Today**,11(1):7-9;1995.

TARLETON, R .L., ZHANG, L. ; DOWNS, M. O. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific responses to infected host tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 3932-3937, 1997.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN,M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**. 356(6367):338-40, 1992.

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

TRISCHMANN, T., TANOWITZ, H.; WITTNER, M. ; BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.**, 45:160-168, 1978.

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

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

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

VORE, S.J.; ELING, T.E.; DANILOWICZ, M.; TUCKER, A.N. ; LUSTER M.I. Regulation of murine hematopoiesis by arachidonic acid metabolites. *Int. J. Immunopharmacol.* 11(5): 435-42, 1989.

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.

WEN, J-J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complex in response to the stress of *T. cruzi* infection. **Free Radic. Biol. Med.** 37:(12)2072-2081;2004.

WERZ, O ; STEINHILBER, C.E. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacol Ther** 112:701-718, 2006.

WHO (World Health Organization). **Technical Report Series, Control of Chagas' disease**, ed. W.H.O. Publications, Geneva, 2002.

WILLENSEN, M. 5-Lipoxygenase inhibition: a new treatment strategy for Sjogren-Larsson syndrome. **Neuropediatrics** 31: 1-3, 2000.

WILIAMS-BLANGERO, S., VANDEBERG, J.; BLANGERO, J.; CORREA- OLIVEIRA, R. Genetic epidemiology of *T. cruzi* infection and Chagas' disease. **Front. Biosci:** 8, 337-45, 2003.

WIRTH, J.J. ; KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**134(3):1989-93, 1985.

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.

MANUSCRITO**Involvement of leukotrienes on parasite burden and oxidative stress in murine Chaga's disease**

Celso Luiz Borges^{*‡}, Vera Lúcia Hideko Tatakihara^{*}, Aparecida Donizette Malvezi^{*}, Viviani Graça-de Souza Krominski[†], Sueli Fumie Yamada-Ogatta[†], Luiz Vicente Rizzo^{}, Rubens Cecchini^{*}, Phileo Pinge-Filho^{*}**

From the Department of Pathological Sciences^{}, Department of Microbiology[†], Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; Department of Clinical Analysis[†], State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil; Department of Immunology^{**}, University of São Paulo Medical School, Division of Allergy and Clinical Immunology, São Paulo, Brazil*

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, 5-Lipoxygenase, Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA), anemia, oxidative stress, nitric oxide

Supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (478239/01-7) and FAEP/UEL.

Address reprint requests to Phileo Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: + 55 43 3371-4267; Fax: + 55 43 3371-4465

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

Abstract

In this study, the involvement of leukotrienes in the anemia associated with oxidative stress in the acute phase of infection with *Trypanosoma cruzi* was evaluated in C57BL/6, 129sv (WT, wild-type) mice and knockout mice to 5-lipoxygenase (5-LO^{-/-}) and inducible nitric oxide synthase (C57BL/6 iNOS^{-/-}). Mice were infected with 5 x 10³ trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Y strain). After four hours, selected mice were treated or not with 200µL of the NDGA (nordihydroguaiaretic acid, 5-lipoxygenase inhibitor, 1.25 mg/animal/day). *Tert*-butyl hydroperoxide-initiated-chemiluminescence (CL) analysis carried out in non-lysed erythrocytes from *T. cruzi* infected-mice (12th day) showed a dramatic increase in CL indicating both reduced levels of antioxidants and increased erythrocyte membrane lipid peroxide. Our findings support those of previous studies regarding the role of nitric oxide on systemic oxidative stress in acute-phase of experimental *T. cruzi* infection. In addition, we clearly demonstrate that, despite the fact that leukotriene B4 (LTB₄) induces nitric oxide synthesis in *T. cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection, 5-lipoxygenase pathway is essential in the control of load parasitic in the blood and cardiac tissue. Moreover, 5-lipoxygenase pathways are involved in pre-hemolytic-oxidative stress damage mediated mainly by nitric oxide.

Introduction

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi is an intracellular parasite that causes American trypanosomiasis (Chagas' disease). *T. cruzi* trypomastigotes can infect many different mammalian cell types in which they differentiate and multiply as amastigotes forms. Macrophages can act both as host cells for the parasite and as effectors cells in the anti-parasite immune responses^{1,2}.

The murine experimental infections usually show an acute stage with high parasitemia and prominent inflammatory infiltrates in several tissues, including the heart and skeletal muscles as well as the viscera of the digestive tract³. At the moment, the mechanisms that induce this inflammatory reaction and its role in the resistance and/or the outcome of the disease are not fully understood.

Several pro-inflammatory cytokines that tailor the protective immune response in the acute phase can play a role in its onset. In the early infection, host resistance depends on the T helper type 1 (Th1) protective response⁴, triggered by IL-12 and IL-18⁵ that synergistically activate T cells and natural killer cells to produce interferon gamma (IFN- γ)⁶. In turn, IFN- γ and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) stimulate phagocytic cells to destroy internalized parasites, mainly through nitric oxide (NO) generation⁷, resulting in a raise of reactive intermediates from oxygen (ROS)⁸ and reactive nitrogen species (RNS)⁹. The production of other inflammatory mediators, such as IL-1¹⁰ and IL-6¹¹, and eicosanoids are also enhanced¹². More recently, it was shown that type I IFNs (IFN-I) stimulate NO production and resistance to *T. cruzi* infection¹³. On the other hand, interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor β appear to modulate negatively the production of NO and *T. cruzi* killing induced by pro-inflammatory cytokines^{14,15}.

T. cruzi infection in mice is associated with severe hematological changes, including thrombocytopenia¹⁶, neutropenia following by neutrophilia and eosinophilia¹⁷, which may contribute to mortality. Similar hematological alterations have also been described in

experimental African trypanosomiasis¹⁸ and are a common characteristic of human immunodeficiency virus infection¹⁹ and malaria^{20,21}. Marcondes and collaborators²² showed that experimental acute *T. cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia and that these alterations can be prevented by nifurtimox (an anti-trypanosomal drug) treatment. In addition, it was shown that IFN-inducible p47GTPase (LRG-47) influence *T. cruzi* control by simultaneously regulating macrophage-microbicidal activity and hemopoietic function²³. Nevertheless, the mechanisms responsible for these hematological alterations during *T. cruzi* infection are not completely understood.

Studies of *T. cruzi* infection and disease in animal models have shown that, in the chagasic myocardium, sustained oxidative stress occurs in association with mitochondrial dysfunction²⁴⁻²⁶. More recently, was demonstrated that chagasic patients showed general increase of oxidative stress parallel to the progression of Chagas disease²⁷ and that antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease²⁸.

Our previous results revealed that nitric oxide (NO) does not play direct role in development of anemia during *T. cruzi* infection, but contribute together with TNF- α to oxidative pre-hemolytic damage of erythrocytes in infected mice²⁹. Tribulatti and collaborators³⁰ demonstrated that the trans-sialidase (TS) from *T. cruzi* deplete the sialic acid from platelets, increasing its clearance and leading afterwards to a thrombocytopenia observed during acute phase of infection.

Myeloid cells contain substantial amounts of esterified arachidonic acid (AA)³¹ and constitutively express all of the enzymes necessary to hydrolyze it and metabolize it via the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway³², they are capable of generation large quantities of products termed leukotrienes (LTs) within seconds to minutes of encountering an activating stimulus, and a growing body of evidence indicate that LTs are important participants in innate immune

responses³³. Following cellular activation, 5-LO is translocated to the nuclear membrane³², where it receives AA donated by the integral nuclear-membrane protein known as 5-LO-activating protein (FLAP) and sequentially generates 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) and then the unstable intermediate LTA₄. LTA₄ is metabolized to either LTB₄, by LTA₄ hydrolase (LTA₄H), or to cysteinyl leukotrienes — including LTC₄, LTD₄ and LTE₄ — by LTC₄ synthase (LTC₄S)^{33,34}.

Previous studies demonstrated that LTB₄ induced the uptake and killing of *T. cruzi* by murine macrophages³⁵, NO synthesis in *T. cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection³⁶. More recently, was demonstrated that LTs are essential to efficient pulmonary antifungal host defense because they modulate not only NO as cytokine production during infection³⁷. LTs, especially LTB₄ enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae*³⁸ through the activation of NADPH oxidase and play role in the control of parasite burdens in mice infected with *Strongyloides venezuelensis*³⁹, *Leishmania amazonensis*⁴⁰. However, the role of LTs in the heart parasitism, oxidative stress associated with anemia in the early of *T. cruzi* infection has not been investigated.

In the present study, we investigated the effects of inhibition or absence of LTs during *T. cruzi* (Strain Y) infection in mice. Our results reveal for the first time that LTs play an essential role in controlling parasite burdens, as well as in oxidative damage in erythrocytes during acute phase of *T. cruzi* infection.

Material and Methods

This study was reviewed and approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of the Londrina State University, Londrina, Brazil (Process n° 28568/05, CEEA 54/05).

Animals

Male Swiss mice weighing 20-30 g were obtained from the breeding colonies of the animal facility of the Center for Biological Sciences at Londrina State University, Londrina, Brazil. Male C57BL/6 and C57BL/6 iNOS^{-/-} (iNOS KO) mice were obtained from the mouse breeding facilities of the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Male mice lacking the 5-LO enzyme gene (5-LO^{-/-}) and weighing 20-25 g were obtained from The Jackson Laboratory, and age-matched male wild type (WT, 129sv) mice (background, strain 129) were used as controls. Mice were maintained under standard conditions in animal facility within the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, Londrina State University. Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*. All procedures with the animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals.

Lipoxygenase inhibitor

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA), 4-Bis (3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dimethylbutane; NDGA, Sigma, St Louis, USA) was dissolved in absolute ethanol and diluted in PBS. NDGA solution was prepared fresh every day and aliquots were stored at 4°C until used.

Parasites and Experimental Infection

The Y strain of *T. cruzi*⁴¹ was kindly supplied by Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo (Institute of Biosciences, Campinas State University, Campinas, São Paulo, Brazil). This strain was maintained by weekly intraperitoneally (i.p.) inoculation of Swiss mice with 2×10^5 blood trypomastigotes forms. Infective blood trypomastigotes were obtained from *T. cruzi*-infected mice by drawing blood via cardiac puncture following anaesthetization. Motile blood forms were counted and the desired number of parasites (5×10^3) was injected intraperitoneally (i.p.) in C57BL/6, 5-LO^{-/-} and WT mice.

Determination of Parasitemia

Parasitemia was assessed by counting circulating parasites in 5 μ L of blood obtained from a tail vein of infected mice. These data were expressed as the number of parasites per milliliter of blood. Parasitemia and survival rates were determined daily, beginning at the 5th day of infection⁴².

Treatment of mice with NDGA

NDGA at dose levels of 1.25 mg/animal/day were injected ip in mice at a daily dose. Groups of 6-10 mice were used. C57BL/6, 5-LO^{-/-} and WT (129Sv) mice received the first dose 4 h after infection and were treated until they died or until the end of experiment (40 days after infection); parasitemia and mortality were evaluated in the same period. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. In order to evaluate drug toxicity, normal mice were inoculated only with NDGA until 30 days, using the same treatment schedule. The dose of NDGA chosen for these experiments was based on previously published studies demonstrating its efficacy⁴³.

Collection of blood and haematological analyses

Erythrocytes and leukocytes from normal and infected mice under ether anesthesia, were collected from cardiac puncture with heparinized needles and syringes and counted by standard methods⁴⁴. Hemoglobin concentration was determined by the Drabkin method. Hematocrits were obtained by microcentrifugation of capillary tubes filled with heparinized blood⁴⁵. All blood analysis and cell counts were performed 12 days post-infection. Platelets were counts from peripheral blood from normal and infected mice anaesthetized, in polypropylene tubes containing 3.8% (wt/vol) sodium citrate (citrate/blood ratio, 1:9)³⁰. All the manipulations were carried out at room temperature. The number of platelets and blood cells were determined by manual counting with a Neubauer hemocytometer.

Bone marrow cell harvest

Bone marrow cells were harvested by flushing the femoral shafts with ice-cold PBS, as previously described⁴⁶. The total number of cells collected was determined by manual hemacytometer count. For differential counts, cell suspensions from uninfected and day 12-infected mice were deposited on glass slide, stained with May Grünwald-Giemsa, then counted by light microscopy.

Histopathological study

On day 12 of infection, C57BL/6,Wt 129sv mice treated or not with NDGA and 5-LO^{-/-} mice were sacrificed. Hearts were removed, rinsed with saline (PBS), and fixed for 24h in 10% buffered formalin. Fixed hearts were embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin/eosin (H&E), and examined by light microscopy. The number of parasite nests was counted in 50 microscope fields (1×400 magnification) per tissue section. Three sections were counted for data and determined as the mean result of the three sections.

Macrophages cultures and quantification of nitrite (NO₂⁻)

Peritoneal cells (PCs) were prepared from normal and infected (day 12 pi) mice treated or not with NDGA. Four days after i.p. injection of 1.5 mL of 5%(wt/vol) sodium thioglycollate (LABSYNTH, Diadema, BR) medium to mice, cells were harvested from the peritoneal cavity by injecting cold PBS, centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C, resuspended in RPMI1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, CRILON), 50 mg/mL gentamicin, 100 u/ML penicillin, 100ug/ml streptomycin and 2 mM glutamine. The PCs suspension was dispensed into 96-well tissue culture plates (10^6 cells/ml) for 4 h at 37°C to allow the cells to adhere to the plastic surface, followed by washing with warm PBS to remove nonadherent cells. For each experiment, PCs from three mice were pooled. Macrophage monolayers (2×10^5 cells/200 μ L) from Wt 129sv and 5-LO^{-/-} mice were incubated at 37°C in 5% CO₂ in the presence or absence of NDGA in the final concentration of $10 \mu\text{M}^{47}$ with or and without LPS from *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma, St Louis, USA, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Nitrite (NO₂⁻) accumulation in 24h supernatants of cultured cells was used as an indicator of NO production and was determined by the Griess reaction with sodium nitrite as a standard, as previously describe (detection limit: 1:56 μM)⁴⁸. Fifty microliters of supernatant were incubated for 10 min, in the dark, at room temperature, with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid). The absorbance was determined at 540 nm.

Determination of oxygen uptake and induction time (T^{ind}) in erythrocytes

Heparinized blood samples from uninfected and infected 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 twice with a 10 mM sodium phosphate buffered saline (0.9% NaCl, pH 7.4), and then resuspended in the

same buffer (1:99, v/v). *t*-butyl hydroperoxide 2 mM (*t*-BHT) induced oxygen uptake and induction time were measured with a Clark-type oxygen electrode at 37°C⁴⁹. The induction time is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity, while oxygen uptake is an indirect measure of the susceptibility of erythrocytes membranes to lipid peroxidation elicited by *t*-BHT⁵⁰.

Tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (CL)

Mouse heparinized blood erythrocytes from different experimental groups were sedimented by centrifugation (800g, 10 min) at 25°C, and then washed twice with saline. Erythrocytes 1% suspension was prepared with 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate at the moment of its use. The chemiluminescence reaction (CL) was initiated by the addition of 20 µL *tert*-butyl hydroperoxide at final concentration of 0,6mM in 1 mL⁵¹. CL was measured in a Luminometer TD20/20 (Turner Biosystems, Sunnyvale CA, USA). The results were expressed in cpm/mg protein. The entire curve was used as an indicator of lipid peroxidation. The initial rate (V_0) was obtained in the ascending part of the CL curve⁵². Protein concentration was determination by the method of Lowry and collaborators⁵³ modified by Miller⁵⁴.

Statistical analysis

Arithmetic means and standard deviations of means were calculated. The impact of infection and treatments were determined by two-way analysis of variance (ANOVA). When significant main effects were noted, differences between individual groups were tested using Bonferroni multiple comparisons method. Survival curves were compared using the Mantel–Haenszel log rank test. All statistical analysis was made using GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Leukotrienes (LTS) modulate the in vivo T. cruzi infection

To verify the importance of LTs in the control of *T. cruzi* infection in vivo, we used pharmacological and genetic approaches. Initially, C57BL/6 and WT sv/129 were i.p infected with strain Y blood forms, C57BL/6 and WT sv/129 developed higher parasite counts (Figures 1A and 1B), but both mouse strains survived the infection (Figure 2). Moreover, while both mouse strains controlled parasitemia levels, the treatment them with NDGA dramatically increased the number of blood parasites in relation to mice untreated (Figures 1A and 1B). The analysis of the survival rate of *T. cruzi* infected C57BL/6 and WT 129sv mice treated with NDGA shows that mortality was observed from 20th day of infection in 129sv mice and this reached 100% on the 23th day (Figure 2). Surprising, all C57BL/6 untreated-infected-mice and C57BL/6 NDGA-treated-infected mice survived until the end of experiments (40th day after infection) (Figure 2). 129 5-LO^{-/-} infected with *T. cruzi* Y strain, were more susceptible than C57BL/6 and WT 129sv, reaching higher parasitemia and mortality (Figures 1B and 2). Parasitic load in the blood peaked 9 days post-infection was significantly higher in 129 5-LO^{-/-} compared to C57BL/6 and WT 129sv mice and declined progressively thereafter. There were large and statistically significant differences ($P < 0.001$) in survival between all two strains of mice studied (Figure 2).

In addition, we analyzed the effect of 5-LO inhibition on parasitism in heart tissue taken from C57BL/6, WT 129sv and 129 5-LO^{-/-} mice treated or not with NDGA at 12 days after infection with *T. cruzi*.

On day 12 p.i, the heart tissue from C57BL/6 mice treated with the NDGA had five-fold more parasites nests than those of untreated mice (Figure 3, $P < 0.05$). In the same period

of infection, WT 129sv mice had ten-fold more parasites those C57BL/6 (Figure 3, $P < 0.05$) and the treatment these mice with NDGA increased twice more parasites nests in the heart than those untreated (Figure 3, $P < 0.05$). Heart from 129 5-LO^{-/-} infected-mice had more parasites nests than mice infected with *T. cruzi*, treated or not with NDGA (Figure 3).

Leukotrienes (LTS) do not participate in the development of the anemia, thrombocytopenia and leukopenia in T.cruzi-infected mice

To address the question of the role of LTs in the progress of anemia during *T. cruzi* infection, we conducted blood cells counts and measured several haematological values in C57BL/6, WT 129sv and 5-LO^{-/-} mice. We used uninfected mice, *T. cruzi*-infected mice treated or not with NDGA at 12 days post-infection. Based on significant decreases in hemoglobin, hematocrit, erythrocyte numbers, platelets and leukocytes counts, all mice strains studied suffered from anemia on 12th day post-infection (Table I). The severity of the anemia was greatest for C57BL/6 mice. Interestingly, the inhibition or absence of endogenous LTs production did not impact on the extent of anemia, thrombocytopenia and leukopenia that developed 12 days post-infection in the two mice strains (Table I). *T. cruzi* infection in mice was associated with a significant decrease in total number of bone marrow cells (Table I). In addition, 5-LO absence or the pharmacological inhibition of 5-LO with NDGA had no effect on bone marrow hypoplasia in *T. cruzi*-infected mice (Table I).

LTs induces nitric oxide production in macrophages from T.cruzi-infected mice

Next, we evaluated whether the 5-LO absence or in vivo treatment of infected mice with NDGA could be alter the production of NO by activated macrophages from *T. cruzi*-infected mice. We observed that macrophages from C57BL/6 and WT 129 sv mice treated

with NDGA (10 μ M) and 5-LO^{-/-} mice (all on 12th day of infection) significantly inhibited the production of NO induced by LPS-stimulated macrophages (Figure 4).

Erythrocyte Oxidative Stress

Oxygen uptake by erythrocytes is directly associated with the susceptibility of the erythrocyte membrane to undergo lipid peroxidation elicited by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) and is proportional to previous oxidative stress experienced by the erythrocyte *in vivo*. The oxygen uptake by erythrocytes from all groups of mice significantly increased 12 days following infection (Figure 5). The treatment with NDGA used significantly diminished erythrocyte oxygen uptake in C57BL/6 infected-mice (Figure 5A, $P < 0.05$). In accordance, the 5-LO^{-/-} infected-mice (Figure 5B), also had but not in C57BL/6 iNOS^{-/-} *T. cruzi* infected-mice (Figure 5C, $P > 0.05$).

Induction time (T^{ind}) is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity of the erythrocyte. *T. cruzi* infection in the C57BL/6, WT 129sv mice but not in 5-LO^{-/-} mice resulted in a significant reduction in T^{ind} (Figure 6A, Figure 6B and Figure 6C, $P < 0.05$). Treatment of C57BL/6 (Figure 6A, $P < 0.05$) but not of C57BL/6 iNOS^{-/-} (Figure 6C, $P > 0.05$) mice with NDGA completely abrogated the infection-associated decline in T^{ind} . Prior to infection, T^{ind} was significantly longer in erythrocytes isolated from 5-LO^{-/-} mice (Figure 6B) compared to C57BL/6 mice (Figure 6A, $P < 0.05$).

Tert-butyl hydroperoxide initiated CL was used to analyze the levels of lipoperoxides in erythrocytes from infected mice treated or not with NDGA or from mice lacking the 5-LO enzyme gene. This test is based on the assumption that an increase in CL is related to the oxidative stress previously suffered by the erythrocyte during *T. cruzi* infection, inducing the consumption of antioxidant defenses and the formation of lipoperoxides resulting in an increase in photon emission ref.

The Figure 7 shown the time course of *tert* butyl hidroperoxide-initiated CL of mice from *T. cruzi* infection. The CL time course curves of erythrocytes from the C57BL/6 (Figure 7A), C57BL/6 iNOS^{-/-} (Figure 7B) and WT 129sv (Figure 7C) infected-mice (on day 12 after infection), showed a significant photon emission increase and shift of its maximum to the left. It means an increased lipid peroxides and reduced antioxidant defenses in the erythrocytes membrane from *T. cruzi* infected-mice (day 12 of infection). The NDGA treatment of C57BL/6 and WT129sv mice (Figures 7A and 7B) or the absence of 5-LO in 5-LO^{-/-} infected-mice (Figure 7C) was able to quench significantly the photon emission. 5-LO-mediated inhibition of *tert* butyl hidroperoxide initiated CL in erythrocytes from *T. cruzi* infection was not observe in infected-mice lacking the inducible nitric oxide synthase enzyme gene (C57BL/6 iNOS^{-/-}), Figure 7B. These results indicate that leukotrienes play a role in pre-hemolytic damage during experimental *T. cruzi* infection in a nitric oxide dependent manner.

Discussion

In the present study, we demonstrated that 5-Lipoxygenase (5-LO) plays an important role during *T. cruzi* infection. Our results show for the first time that leukotrienes participates in the control of the parasitic burden in the blood and cardiac tissue and in the erythrocytes oxidative stress leading to pre-hemolytic injury during the acute phase of *T. cruzi* infection.

Impairment of leukotrienes synthesis, by either pharmacologic or genetic means, clearly resulted in increased numbers of trypomastigote forms in the blood and amastigote forms in the heart from infected-mice. This may be attributable to altered resistance to parasite in the absence of leukotrienes, as demonstrated in this study. In fact, LTB₄ induces nitric oxide synthesis in *T. cruzi*-infected mice and mediates resistance to infection³⁶. All strains (C57BL/6, WT 129 sv and 5-LO^{-/-}) of mice infected with *T. cruzi* had anemia on 12th

day of infection. NDGA treatment had not effect on anemia, thrombocytopenia and leukopenia in the acute phase of *T. cruzi* infection. In according, mice lacking the 5-LO enzyme (5-LO^{-/-}) also developed anemia. Our results suggest that the leukotrienes do not participate directly on anemia during the early of *T. cruzi* infection. In fact, was demonstrated that leukotrienes appear do not act in the recovery of the hematopoiesis in mice⁵⁵ although they are pointed as essentials for the formation of myeloid cells⁵⁶.

The production of NO by activated macrophages is thought to be the major effector mechanism during experimental *T. cruzi* infection^{7,9,57,58}. In the present study, we evaluated the effect of pharmacologic inhibition or absence of 5-LO on NO production by macrophages from infected-mice (Day 12 after infection) stimulated in vitro with LPS. The activation of macrophages with LPS induced increase in NO production by peritoneal macrophages from WT 129sv infected-mice. The NDGA treatment partially blocked the effects of leukotrienes on NO production, as expected. In the same way, the peritoneal macrophages from 5-LO^{-/-} mice also produced less NO in relation to control mice. These results corroborate previous findings, which demonstrated the ability of LTB₄ to induce the production of NO by *T. cruzi*-infected peritoneal macrophages³⁶. However, differently to our results and those of Talvani and collaborators³⁶, others have found that leukotrienes do not regulate NO production in RAW 264.7 macrophages⁴⁷. The authors observed that exogenous LTB₄ had not effect on either NO or PGE₂ production and that NDGA inhibited production of NO only at doses were cytotoxic to the RAW cells. Of note, our studies were carried out with macrophages derived from the peritoneal cavities of thioglycolate-treated mice and the concentration of NDGA used (10μM) had not effect on viability of peritoneal macrophages stayed around 90% after NDGA-treatment (data not shown). Future studies should address why macrophage populations, stimulated or not, derived from other sources respond in a unlike manner.

In previous studies we demonstrated the participation of NO and TNF- α in the systemic oxidative stress associated with the anemia that occurs during the early of the infection with *T. cruzi*²⁹. Therefore, data in literature have demonstrated that in the experimental model of *T. cruzi* infection the increased oxidative stress and antioxidant insufficiency are associated with myocardial (cellular and mitochondrial) oxidative damage and mitochondrial functional decline and might be of pathological significance in Chagas disease²⁴⁻²⁶. In this article, we verified the relevance of leukotrienes to systemic oxidative stress in experimental *T. cruzi* infection.

The erythrocyte is a good model for investigation of cell damage mechanisms of induced by oxidizing agents. Oxidative damage to cell components and cellular metabolism results in impaired rheological properties of circulating red blood cells and is involved in the development of some pathologies. In this study we assessed oxidative stress in erythrocytes by measuring oxygen uptake, induction time (T^{ind}) and by *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL). In according with previous studies²⁹, we found that an acute infection of mice with *T. cruzi* was generally associated with increased erythrocyte oxidative stress. Further, we found confirmation of lipid peroxidation in erythrocytes (i.e., increased oxygen uptake and decreased time induction) from *T. cruzi*-infected C57BL/6 and WT 129sv mice. NDGA treated-infected-mice or 5-LO^{-/-} mice had reduced erythrocyte oxygen uptake and increased of T^{ind} in the acute phase of *T. cruzi* infection (day 12 p.i) when compared to untreated infected mice. These results suggest that leukotrienes play a role in lipid peroxidation of erythrocyte membranes. In order to assure the erythrocytes lipid peroxidation involvement in *T. cruzi* infection, a more sensitive technique was employed, whose principle is photon emission (CL). The CL time course curves of erythrocytes from infected-mice (day 12 after *T. cruzi* infection), showed a significant increase when compared to control (uninfected mice). C57BL/6, WT 129sv infected and treated with NDGA or 5-LO^{-/-} infected-mice had decrease in the CL time course curves of erythrocytes, therefore CL confirmed that

leukotrienes increased lipid peroxidation levels in erythrocyte during the early of murine *T. cruzi* infection.

However, blocking in endogenous NO production with aminoguanidine in C57BL/6 decrease the oxygen uptake and increase Tind. However, in the absence of enzyme iNOS in C57BL/6 iNOS^{-/-} mice significantly increase oxygen uptake and decrease the Tind by erythrocytes²⁹ just as it had done in 5-LO^{-/-} mice. Interesting, the pharmacological blockade of 5-LO with NDGA attenuate the lipid peroxidation in erythrocytes from C57BL/6 *T. cruzi*-infected-mice but not in C57BL/6 iNOS^{-/-} infected-mice, showing that the action of NDGA is dependent of endogens NO. Despite the fact that NDGA treatment could be increased macrophage PGE₂ release, merits further investigation.

We do not know for certain how *T. cruzi* infection causes oxidative stress in erythrocytes, but we believe that phagocyte-derived nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and eicosanoids as leukotrienes are central to this process.

In summary, our results show that leukotrienes play role in the in vivo control of *T. cruzi* in resistant mouse strains and its effect is mediated by increase of nitric oxide generation. In addition, we demonstrated for the first time that leukotrienes cooperate to the increase of pre-hemolytic damage in erythrocyte from *T. cruzi*-infected-mice in a nitric oxide-dependent way.

Table1.Hematological values and bone marrow cells counts of *T. cruzi* infected mice on day 12 post infection^a

Groups	Haemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Platelets (x10 ³ /mL)	Leucocytes (x10 ³ /mL)	Bone Marrow Cells (x10 ⁶ /mL)	Megacariocytes (x10 ³ /mL)
C57BL/6						
N	14.2 ± 0,5	45.2 ± 1.1	914 ± 107	6.2 ± 0.6	59.9 ± 4.2	49.0 ± 12.5
N + NDGA	13.9 ± 0.2	44.0 ± 1.4	1024 ± 99	5.0 ± 0.7	54.3 ± 5.4	46.0 ± 8.9
I	9.3 ± 1.2*	29.2 ± 1.9*	224 ± 90*	2.2 ± 0.5*	25.6 ± 3.0	17.0 ± 5.7*
I + NDGA	9.8 ± 0.9*	31.2 ± 1.5*	258 ± 61*	2.1 ± 0.4*	31.6 ± 3.0*#	16.7 ± 1.1*
C57BL/6 iNOS KO						
N	14.9 ± 1.2	43.8 ± 2.6	1022 ± 111	5.7 ± 0.9	55.9 ± 8.5	70.0 ± 9.3
N + NDGA	14.8 ± 1.4	44.7 ± 2.5	950 ± 134	5.4 ± 1.2	47.2 ± 3.3	60.8 ± 6.3
I	11.5 ± 0.7*	34.6 ± 1.5*	80 ± 10*	1.8 ± 0.4*	5.5 ± 0.5*	3.0 ± 1.1*
I + NDGA	12.2 ± 1.1*	33.3 ± 2.1*	87 ± 7*	1.4 ± 0.2*	5.2 ± 0.8*	3.3 ± 1.1*
129 sv						
N	15.9 ± 0.32	46.7 ± 0.6	520 ± 82	7.0 ± 1.2	39.5 ± 7.0	33.3 ± 5.7
N + NDGA	15.6 ± 0.26	46.3 ± 1.2	647 ± 81	7.5 ± 0.5	42.6 ± 2.0	40.0 ± 10.0
I	12.3 ± 1.22*	36.7 ± 2.1*	122 ± 8*	2.8 ± 0.5*	17.9 ± 3.9*	5.0 ± 0.5*
I + NDGA	11.0 ± 1.06*	35.0 ± 1.0*	125 ± 7*	2.3 ± 0.2*	17.5 ± 4.6*	5.0 ± 0.9*
129 Alox-5 KO						
N	15.7 ± 0.10	47.0 ± 2.5	425 ± 7*	6.7 ± 1.9	47.9 ± 7.0	35.0 ± 7.0
I	12.8 ± 0.10*	36.0 ± 2.0*	112 ± 8*	3.0 ± 0.7*	17.7 ± 1.9*	5.0 ± 0.7*

Day 12 after *T. cruzi* infection.^a Groups of mice were infected (I) with 5x10³ *T. cruzi* or infected and treated with 50 mg/kg of NDGA. Normal mice (N). Values represent the mean ± SD and are representative of three independent experiments, using 5 to 12 mice per group * Significantly different ($p < 0.05$) when compared with non-infected group. #Significantly different ($p < 0.05$), when compared with infected non-treated group.

Figure Legends

Figure 1. Course of *T. cruzi* infection. Groups of C57BL/6 mice (1A), WT 129 sv and 129 5-LO^{-/-} (1B) mice were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, selective mice received NDGA (1.25 mg/animal/day) by the i.p route. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Parasitemia was quantified as trypomastigotes per milliliter of blood. Results were expressed as the mean \pm standard deviation from 5-10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's test. * $P < 0.05$, significantly different in parasitemia (C57BL/6 vs C57BL/6 + NDGA (1A), WT 129sv + NDGA and 129 5-LO^{-/-} vs WT 129sv (1B).

Figure 2. Survival rate. Groups of C57BL/6 mice, WT 129 sv and 129 5-LO^{-/-} mice were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, selective mice received NDGA (1.25 mg/animal/day) by the i.p route. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results are expressed as the mean \pm standard deviation from 5-10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Dunn's non-parametric test. * $P < 0.05$ curve significantly different from WT 129sv + NDGA and 129 5-LO^{-/-} vs WT 129sv.

Figure 3. Quantification of amastigotes nests from heart of C57BL/6, WT 129sv and 129 5-LO^{-/-} mice on day 12- post infection. Groups of C57BL/6 mice, WT 129 sv and 129 5-LO^{-/-} mice were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, selective mice received NDGA (1.25 mg/animal/day) by the i.p route. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. The number of amastigotes nests was counted in an area of 10 mm² per section. Three sections were counted for each animal and the result is expressed as the mean \pm standard deviation of this three sections. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni`s test. Means not sharing a letter differ with $P < 0.05$.

Figure 4. NO₂⁻ accumulation in cultures of activated macrophages from *T. cruzi* infected-mice (day 12 after infection). Macrophage monolayers (2×10^5 cells/ 200 μ L) from Wt 129sv and 5-LO^{-/-} mice were incubated at 37°C in 5% CO₂ in the presence or absence of NDGA (10 μ M) with or without LPS (1 μ g/mL). After 24 h the accumulated NO₂⁻ was determined in the supernatant by the Griess reaction (see Material and Methods). Results are expressed as the mean \pm standard deviation from 10 animals per group, and are representative of three independent experiments Means not sharing a letter differ with $P < 0.05$.

Figure 5. Erythrocyte oxidative stress on day 12 after *T. cruzi* infection. Here we measured oxygen uptake induced by *tert*-butyl hydroperoxide in erythrocyte from C57BL/6 (5A), WT 129sv, 129 5-LO^{-/-} (5B) and C57BL/6 iNOS KO (5C) mice. Animals were infected with 5 x 10³ trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, selective mice received NDGA (1.25 mg/animal/day) by the i.p route. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results are expressed as the mean ± standard deviation from 5-10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Controls received saline injections only. Values represent the mean ± standard deviation and are representative of five independent experiments, using 5 mice per group. Differences in oxygen uptake were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Means not sharing a letter differ, **P*<0.05.

Figure 6. Erythrocyte antioxidant capacity on day 12 after *T. cruzi* infection. Here we measured induction time induced by *tert*-butyl hydroperoxide in erythrocyte from C57BL/6 (6A), WT 129sv, 129 5-LO^{-/-} (6B) and C57BL/6 iNOS KO (6C) mice. Animals were infected with 5 x 10³ trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, selective mice received NDGA (1.25 mg/animal/day) by the i.p route. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results are expressed as the mean ± standard deviation from 5-10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Controls received saline injections only. Values represent the mean ± standard deviation and are representative of five independent experiments, using 5 mice per group. Differences in oxygen uptake were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Means not sharing a letter differ, **P*<0.05.

Figure 7. Time course curve of *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) in erythrocytes from C57BL/6 (7A), C57BL/6 iNOS KO (7B), WT 129sv and 129 5-LO^{-/-} (7C). Animals were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, selective mice received NDGA (1.25 mg/animal/day) by the i.p route. Normal mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Data from the curves were compared by Turkey-Kramer multiple comparison procedure and Student's *t*-test. * $P < 0.05$ compared to controls. # $P < 0.05$ compared to infected NDGA-treated mice (7A), # $p < 0.05$ compared to WT129sv infected mice (7C).

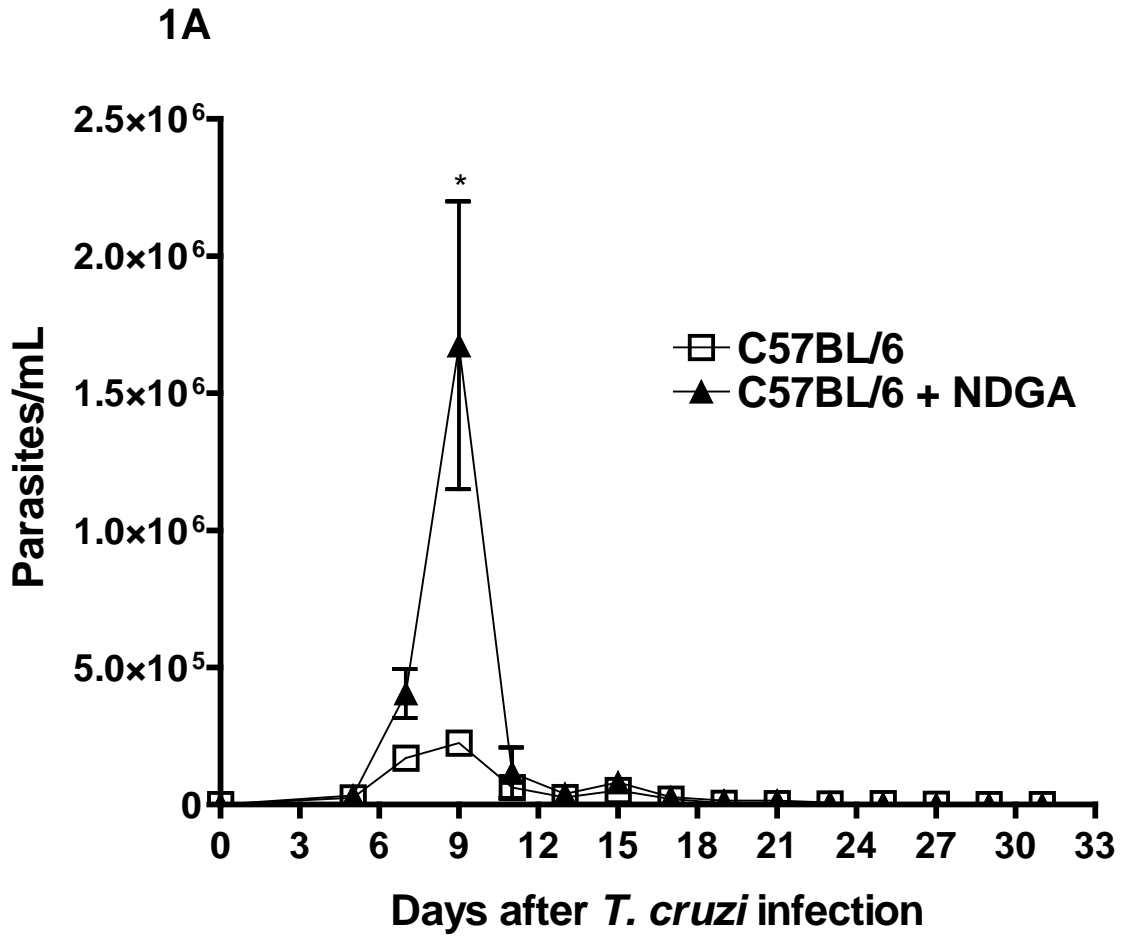


Figure 1

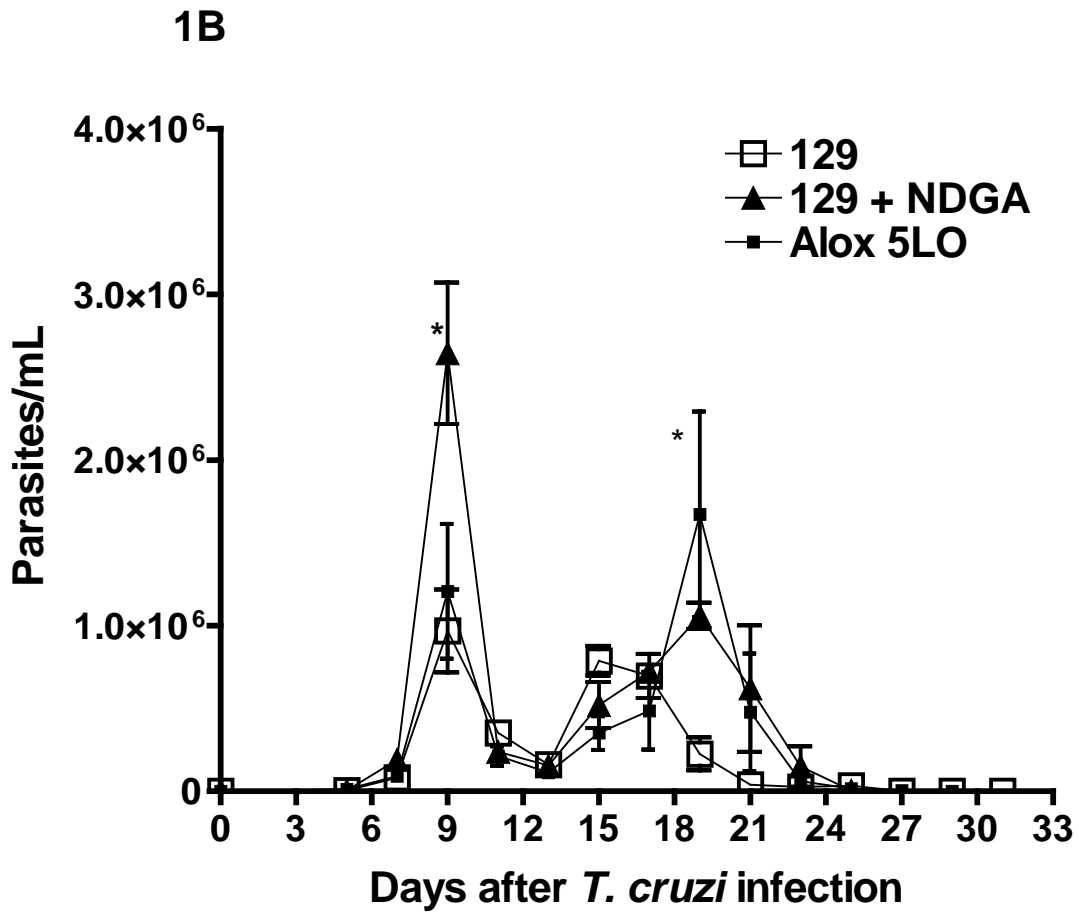


Figure 1

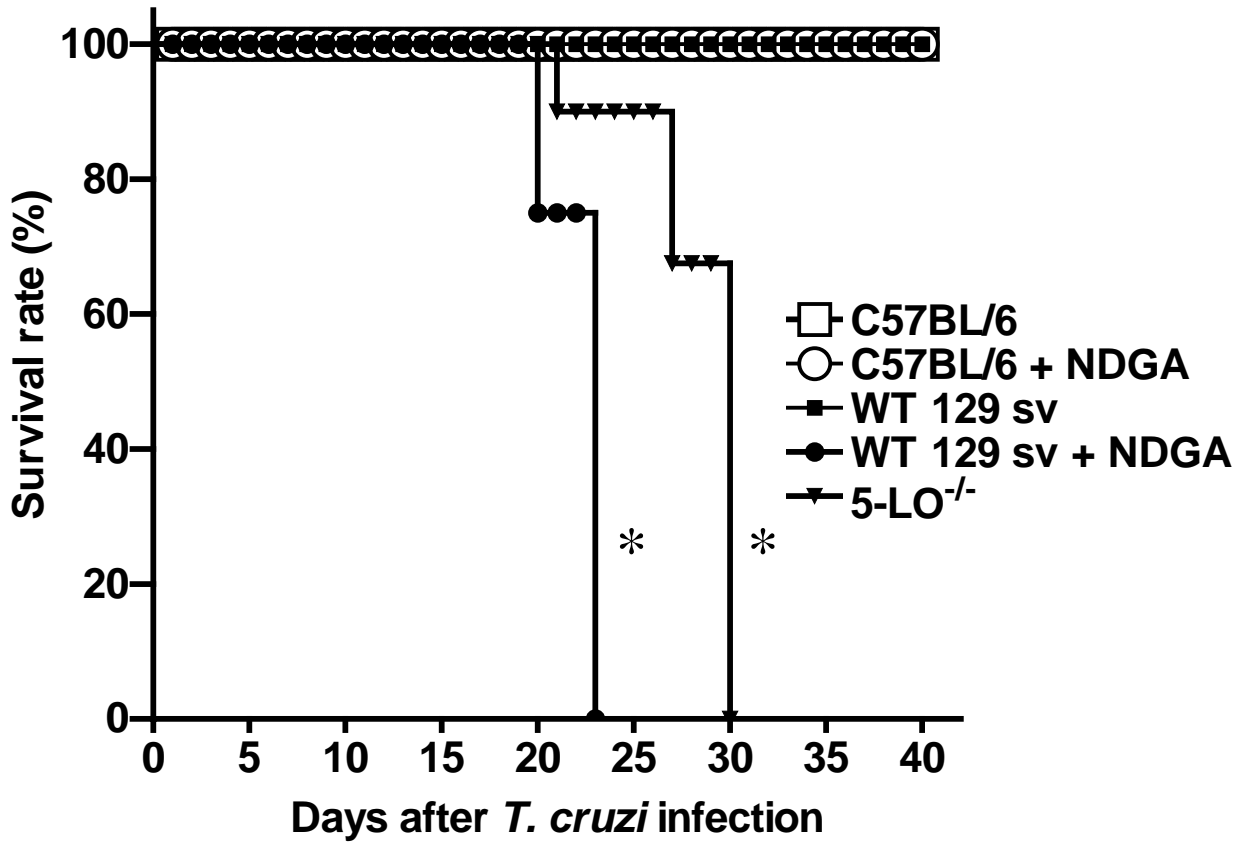


Figure 2

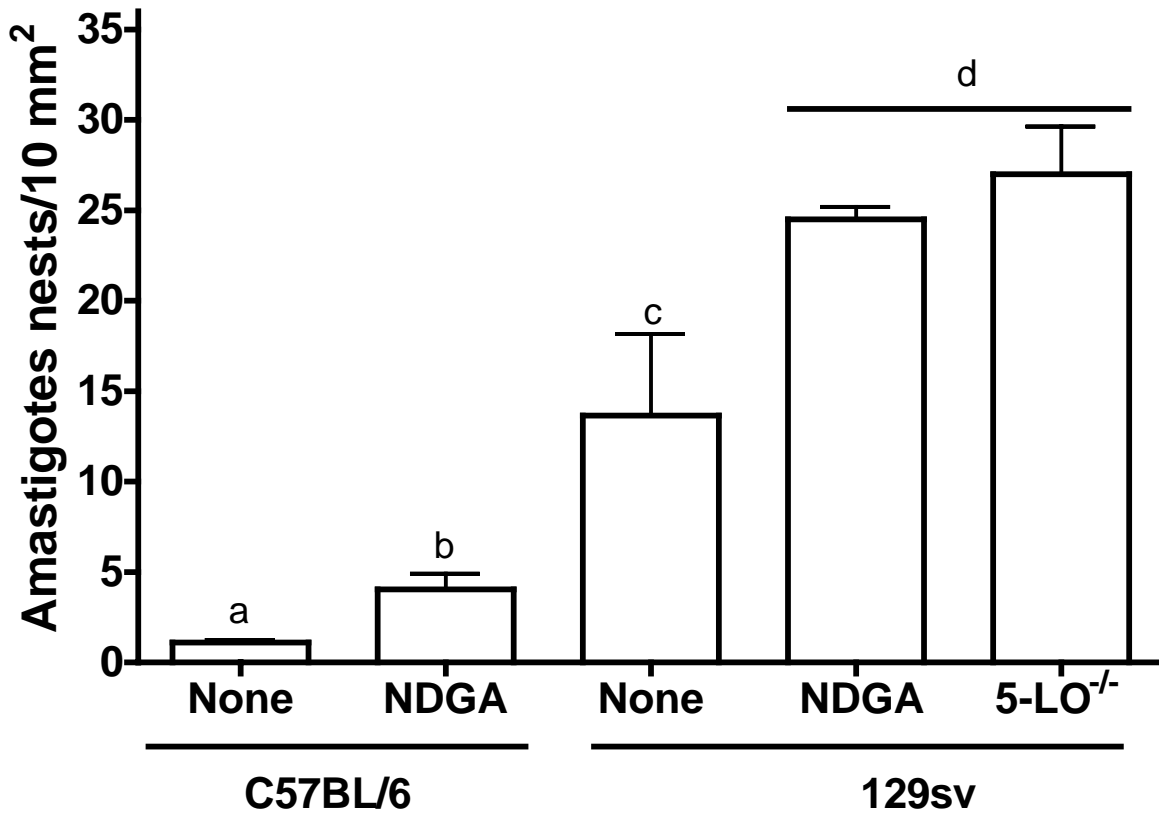


Figure 3

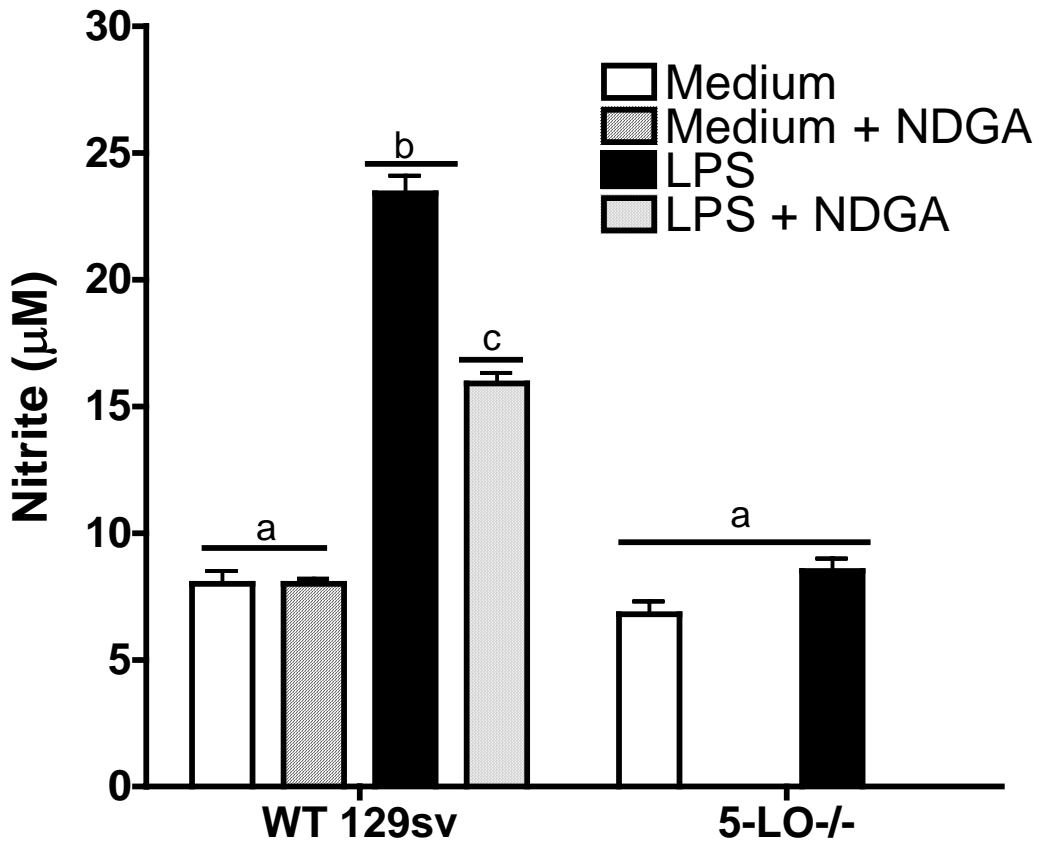


Figure 4

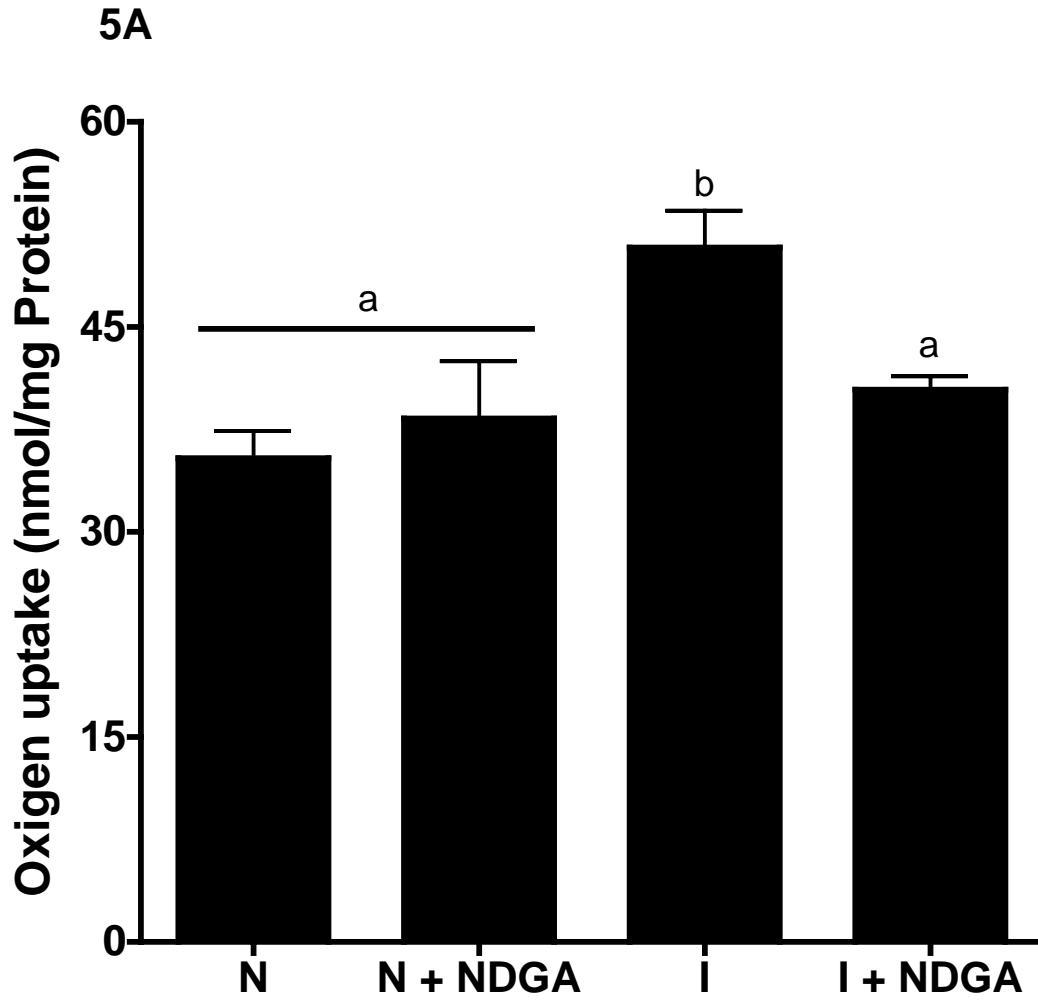


Figure 5

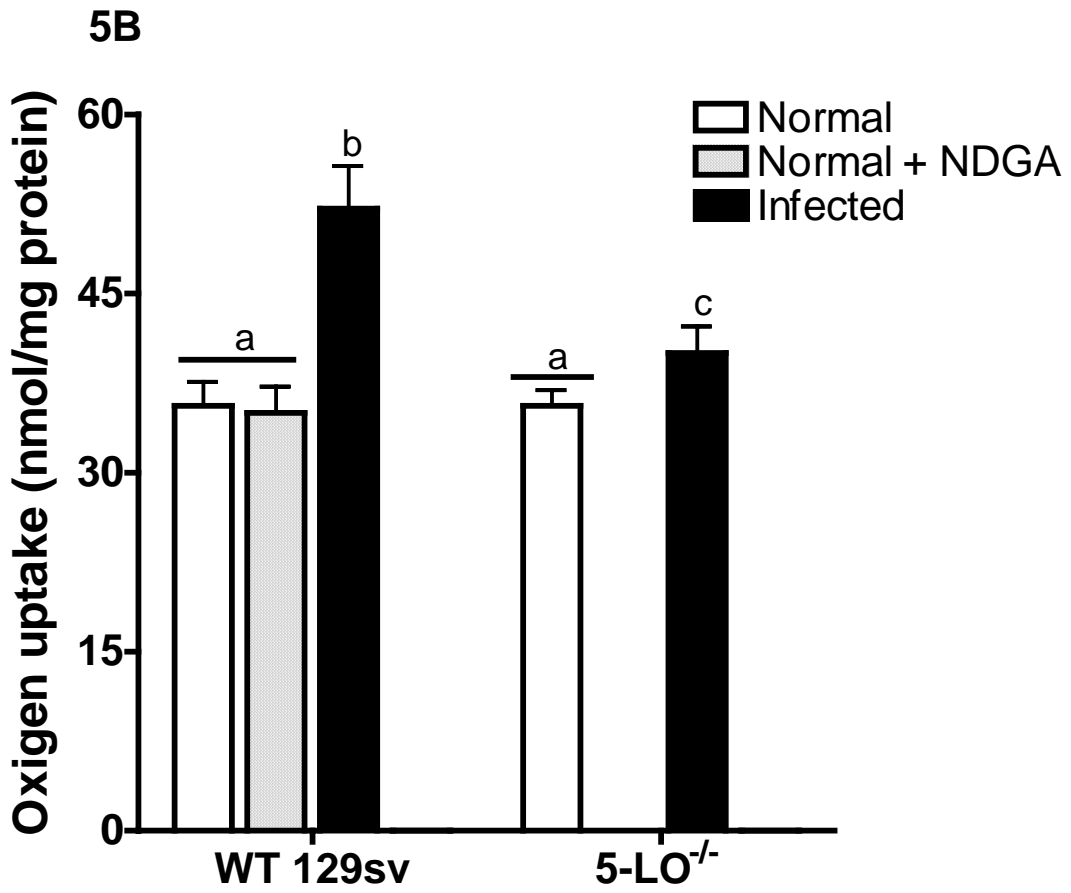


Figure 5

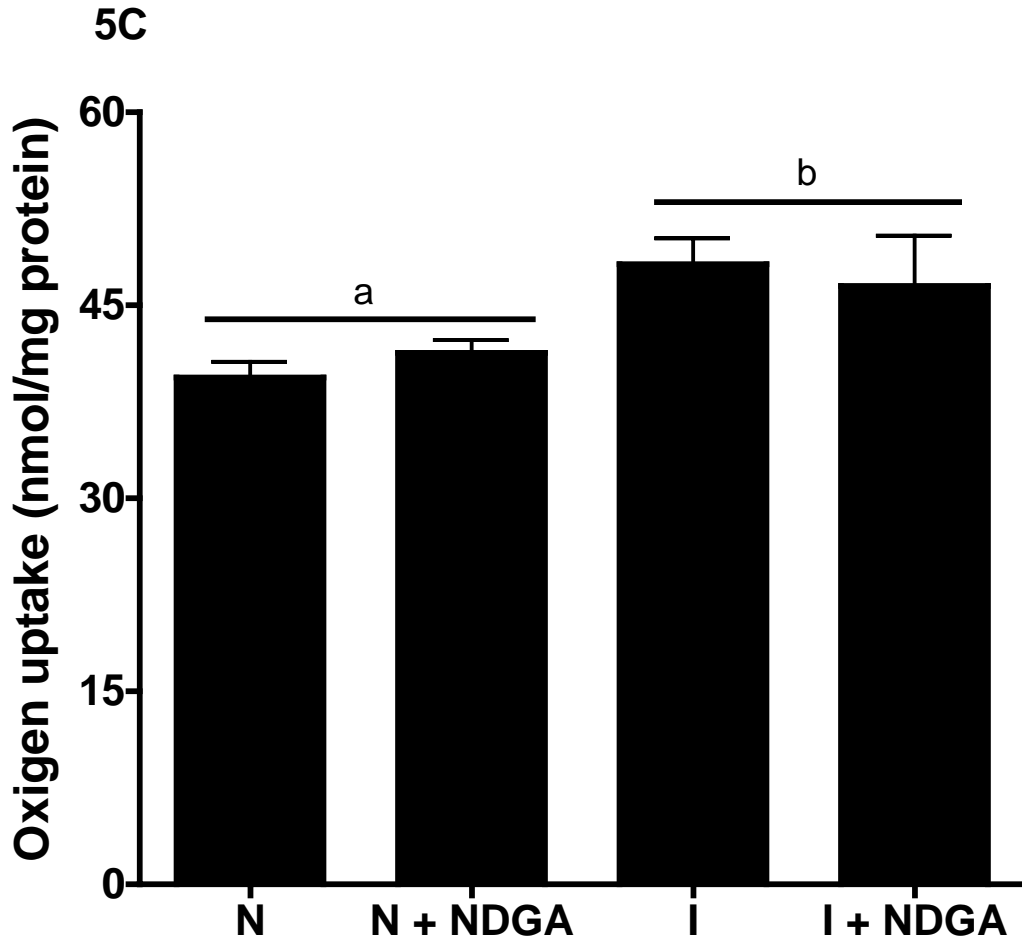


Figure 5

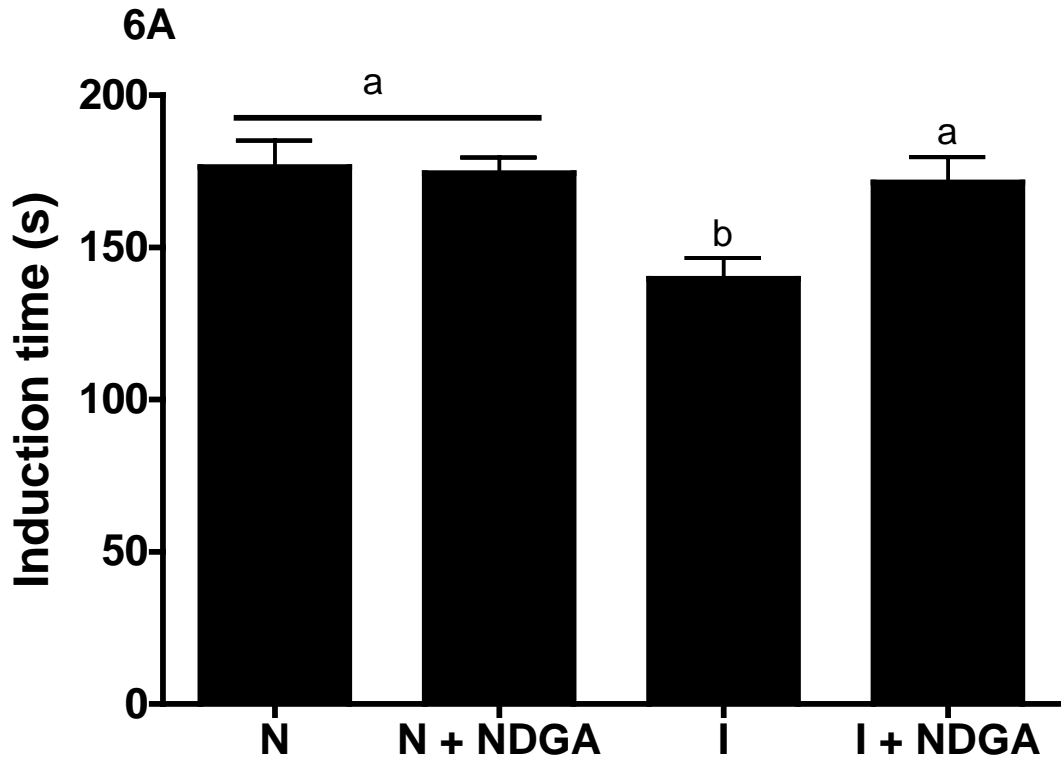


Figure 6

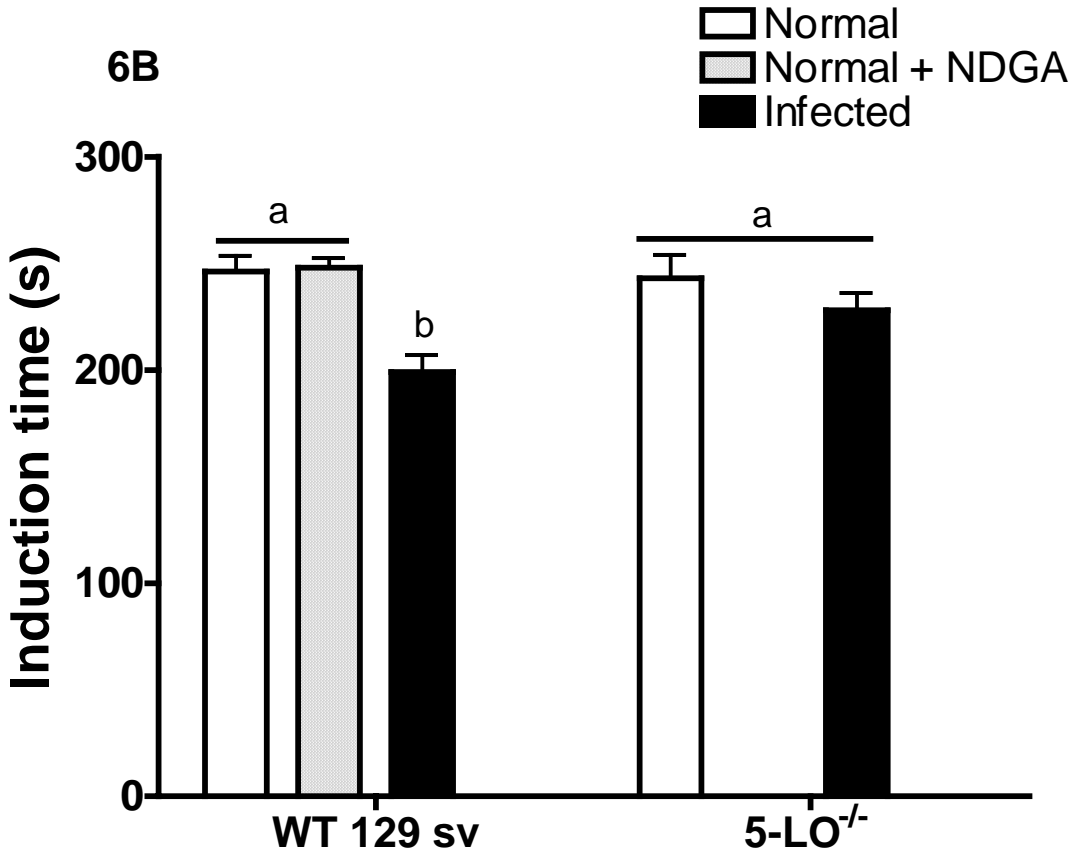


Figure 6

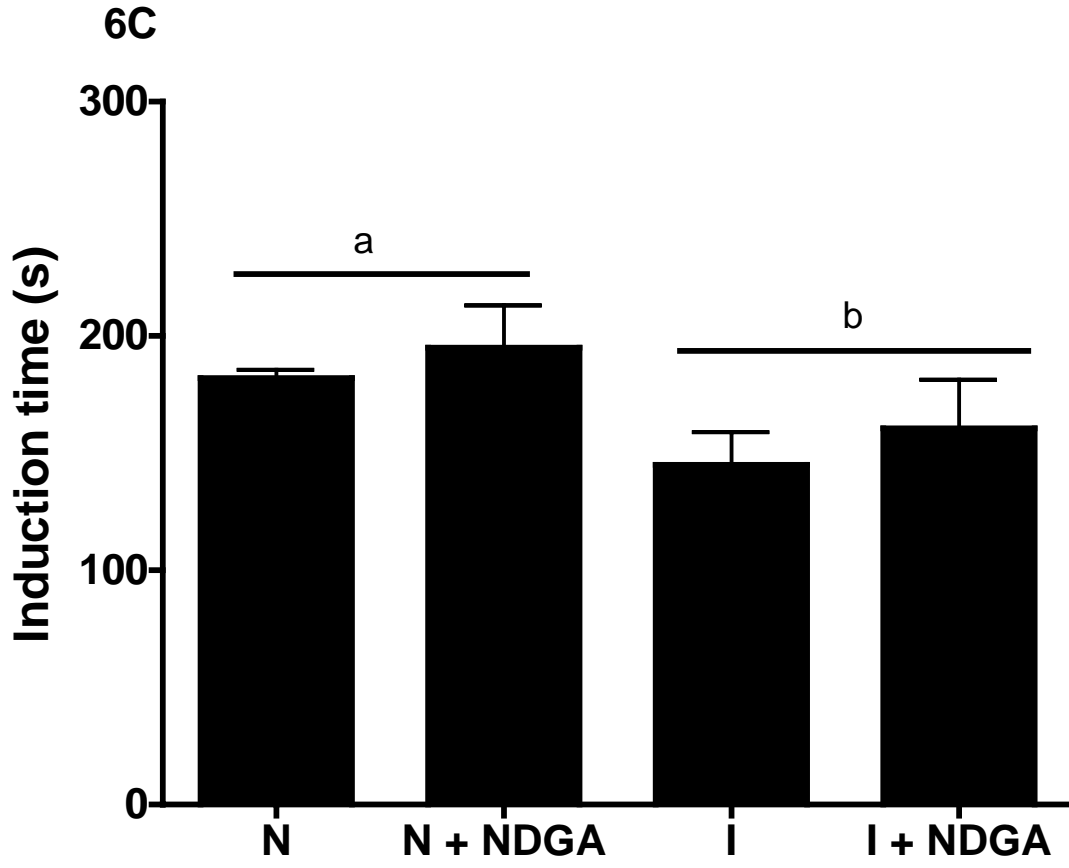


Figure 6

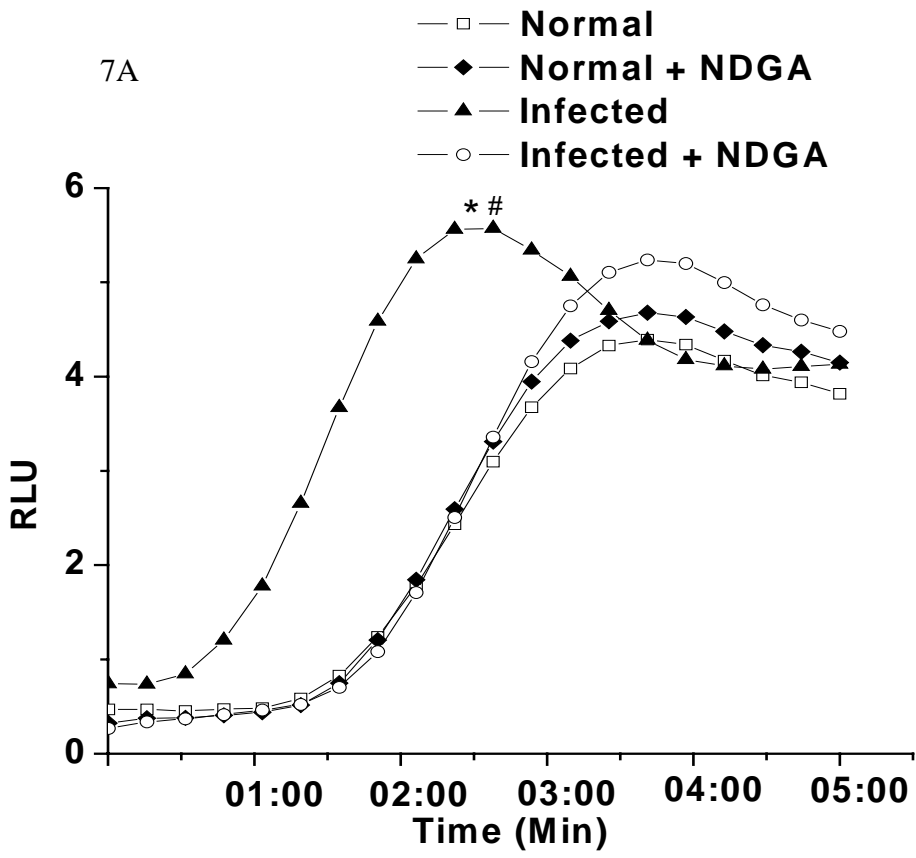


Figure 7

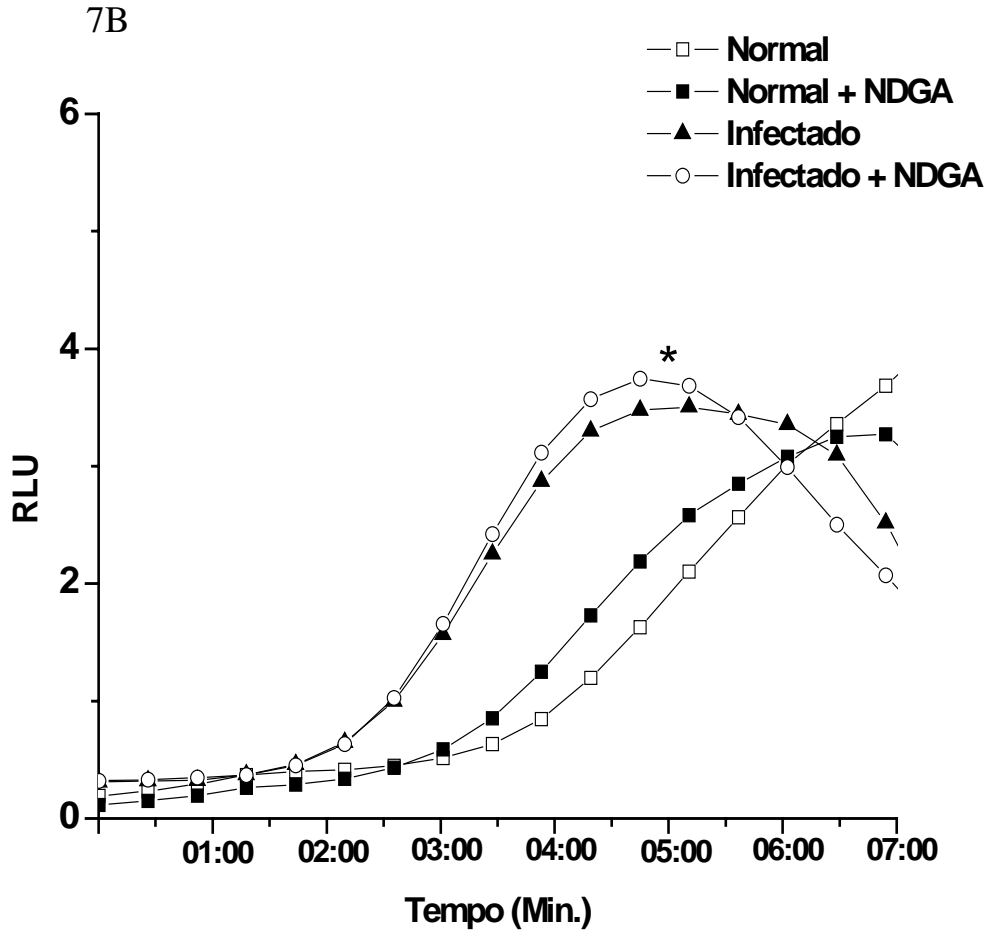


Figure 7

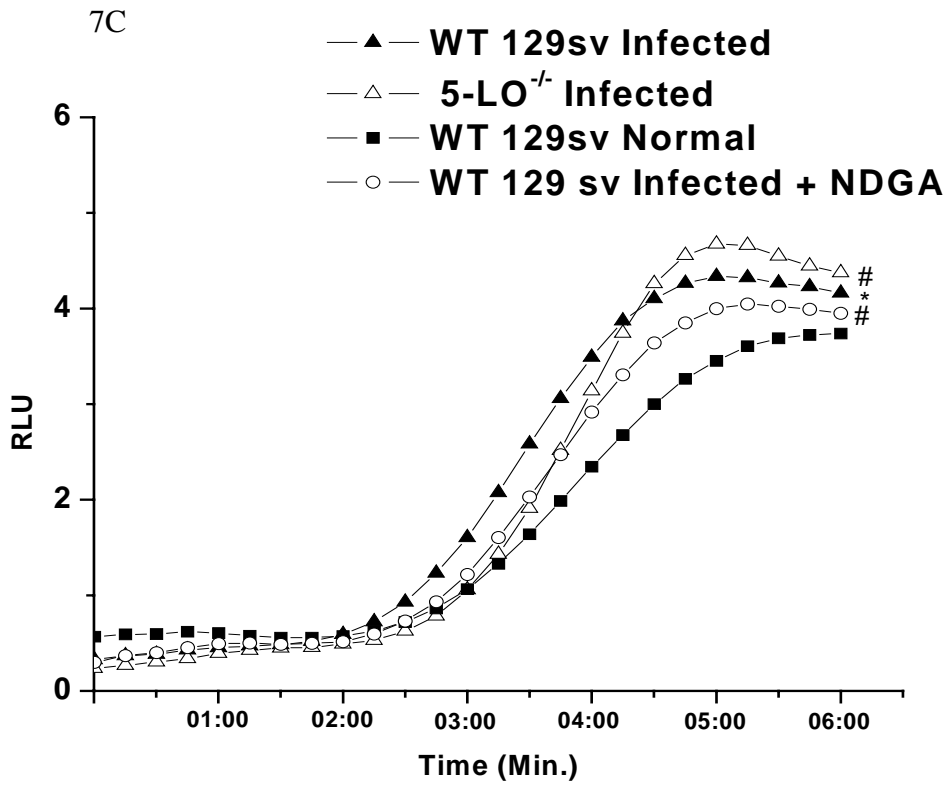


Figure 7

Acknowledgements

We thank Kevin L. Fritsche (Department of Animal Sciences and Molecular Microbiology & Immunology, University of Missouri) for critical review of this manuscript, Fernando Cunha (University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP) for providing WT 129 sv and 5-LO^{-/-} mice and Jesus Antonio Vargas from Pathophysiology Laboratory of Free Radicals (State University of Londrina) for excellent technical assistance. We are grateful to the graduated students Danielle Lima de Santis, Elisângela de Marge Ribeiro and Juneci Mara Soares dos Santos for the breeding pairs of C57BL/6, C57BL/6 iNOs^{-/-}, WT 129sv and 5-LO^{-/-} mice.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Russo N, Starobinas N: Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Res Immunol 1991, 142:144-146
2. Kuhn RE: Macrophages in experimental Chagas' disease. Immunol Ser 1994,60:495- 502
3. Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR: Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006, 101:463-491
4. Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST: Involvement of CD₄⁺ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 2000, 68: 197-204
5. Meyer ZBC, Cramer S, Trumpfheller C, Fleischer B, Frosch S: *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression *in vivo*: correlation with interferon-gamma (IFN- γ) production. Clin Exp Immunol 1997, 110:378-385
6. Akira S: The role of IL-18 in innate immunity. Curr Opin Immunol 2000, 12:59-63
7. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M: Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. Eur J Immunol 1992, 22:301-307
8. Cardoni RL, Antúnez MI, Morales C, Nantes IR: Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1997, 56:329-334
9. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS: Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. Infect Immun 1994, 62:5177-5182
10. Tarleton RL: *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. J Immunol 1988, 140:2763-2768

11. 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* 1994, 62:692-696
12. Cardoni RL, Antúnez MI: Circulation levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators Inflamm* 2004, 13:235-240.
13. Costa VMA, Torres KCL, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA: Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2006,177:3193-200.
14. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG: Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992, 175:169–174.
15. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG: Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med* 1991, 74:539–545
16. Cardoso JE, Brener Z: Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1980, 75:97-104
17. Repka D, Rangel HA, Atta AM, Gavino VA, Piedrabuena AE: Experimental Chagas's diseases in mice infected with one LD⁵⁰ of parasite. *Rev Bras Biol* 1985, 45:309-316
18. Ikede BO, Lule M, Terry RJ: Anemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *Trypanosoma congolense* or *T. brucei*. *Acta Trop* 1977, 34:53-60
19. Claster S: Biology of anemia, differential diagnosis, and treatment options in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2002, 85:105-109

20. Weatherall DJ, Miller, LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ: Malaria and red cell. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002, pp. 35-57
21. Paul RE, Brey PT: Malaria Parasites and red blood cells: from anemia to transmission. Mol Cells 2003, 15:139-49
22. Marcondes MC, 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 2000, 4:347-352
23. Santiago HC, Feng CG, Bafica A, Roffe E, Arantes RM, Cheever A, Taylor G, Vierira LQ, Aliberti J, Gazzinelli RT, Sher A: Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. J Immun 2005, 175: 8165-8172
24. Wen JJ, Vyatkina G, Garg N. Oxidative damage during chagasic Cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. Free Radic Biol Med 2004, 37(11):1821-1833
25. Wen JJ, Garg N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complex in response to the stress of *T. cruzi* infection. Free Radic. Biol. Med. 2004, 37(12): 2072-2081
26. Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, Bhatia V, Garg N: An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. An Acad Bras Cienc 2005, 77:695-715
27. de Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW: Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease (In press) doi:10.1016/j. Int J Card 2006, 04.046

28. Maçao LB, Filho DW, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres AA, Fröde TS: Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. (In press) doi:10.1016/j. Int J Card 2006, 11:118
29. Malvezi AD, Cecchini R, Souza F, Tadokoro CE, Rizzo LV, Pinge-Filho P: Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. FEMS Immunol Med. Microbiol 2004, 41:69-77
30. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O: The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas's disease by reducing the platelet sialic acid contents. Infect Immun 2005, 73:201-207
31. Kanaoka Y, Boyce JA: Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. J Immunol 2004, 173:1503
32. Peters-Golden, M, Brock TG: 5-lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2003, 69:99-109
33. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey M J: Leukotriene: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. J Immunol 2004, 173:589-594
34. Peters-Golden M, Brock TG: Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. FEBS Lett 2001, 487:323-6
35. Wirth JJ, Kierszenbaum: Stimulatory effects of leukotrienes B₄ on macrophage association with an intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 1985, 134:1989-1993
36. Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM: Leukotriene B₄ induces Nitric Oxide Synthesis in *T. cruzi* -Infected Murine Macrophages and Mediates Resistance to Infection. Infect Immun 2002, 12:4247-4253

37. Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH: Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 2004, 72:1637-44
38. Serezani CHC, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M: Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 2005, 106:1067-1073
39. Machado ER, Ueta M, Lourenço EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros A, Faccioli L: Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine Strongyloidiasis. *J Immunol* 2005, 175: 3892-3899
40. Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S: Leucotrienes are essential for the control of *Leshmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 2006, 177:3201-3208
41. Silva LHP, Nussenweig V: Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clin Biol* 1953, 20: 191-207
42. Brener Z: Therapeutic activity and criterion from cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962, 4: 389-396
43. Anjaneyulu M, Chopra K: Nordyhydroguaiaretic acid, a lignan, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology* 2004, 72:42-50
44. Dacie JV, Lewis SM: Basic hematological techniques. In: *Practical Haematology*. Edited by Dacie JV, Lewis SM. Edinburg, Churchill Livingstone, 1994
45. Bain BJ: *Células Sanguíneas: Um guia prático*. Porto Alegre, Artes Médicas Sul LTDA, 1997, pp. 25-51
46. Tadokoro CE, Abrahamsohn IA: Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunol Lett* 2001, 77:31-38

47. Hulkower KI, Pollock JS, Walsh RE, Huang R, Otis ER, Brooks CD, Bell RL: Leukotrienes do not regulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids 1996, 55: 145-149
48. Stuehr DJ, Nathan CF: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 1989, 169:1543-1555
49. Lissi ER, Frans JC, Fernandes V, Videla LA: Effects of antioxidants and haemoglobin status on the *t*-butyl hydroperoxide-induce oxygen uptake by red blood cells. Cell Biochem Funct 1986: 4:447-454
50. Sitozhevsky AV, Havalkin IV, Ivanov VV, Kondakova IV: Kinetics of *tert*-Butyl Hydroperoxide decomposition in erythrocyte suspension. Membr Cell Biol 1997, 11:487-49
51. Simão ANC, Suzukawa AA, Casado MF, Oliveira RD, Guarnier FA, Cecchini R: Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2' -azobis (Amidinopropane). Life Sci 2006, 78:1202-1210
52. Casado MF, Cecchini AL, Simão ANC, Oliveira RD, Cecchin R: Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. Food Chem. Toxicol 2007 (In press) Doi:10.1016/j. Food Chem Toxicol
53. Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL, Randal RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951, 193: 265-75
54. Miller GL: Protein determination of large number of samples 1959, An Chem 31: 964-964
55. Kozubik A, Hofmanova J, Hola J, Netikova J: The effect of nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of prostaglandin and leukotriene biosynthesis, on hematopoiesis of gamma-irradiated mice. Exp Hematol 1993,1:138-142

56. Vore SJ, Eling TE, Danilowics M, Tucker AN, Luster MI: Regulation of murine hematopoiesis by arachidonic acid metabolites. *Int J Immunopharmacol* 1989, 11:435-442
57. Petray P, Cataños-Velez E, Gristein S, Örn A, Rottenberg ME: Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett* 1995, 47:121-6
- 58.** Silva SS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ: Tumor necrosis factor alfa mediates resistance to *Trypanosom cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Inf Immun* 1995, 12: 4862-4867