



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINA PANIS

**PAPEL ANTAGÔNICO DAS ISOFORMAS ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) E INDUZIDA (INOS) EM
CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA 5-LIPOXIGENASE
INFECTADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI*.**

CAROLINA PANIS

**PAPEL ANTAGÔNICO DAS ISOFORMAS ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE CONSTITUTIVA (CNOS) E INDUZIDA (INOS) EM
CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA 5-LIPOXIGENASE
INFECTADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI*.**

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

Orientador: Prof. Dr. Phileo Pinge Filho

Londrina
2009

CAROLINA PANIS

**PAPEL ANTAGÔNICO DAS ISOFORMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
CONSTITUTIVA (CNOS) E INDUZIDA (INOS) EM CAMUNDONGOS
NOCAUTES PARA 5-LIPOXIGENASE INFECTADOS COM
TRYPANOSOMA CRUZI.**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

Londrina, 26 de fevereiro de 2009

DEDICATÓRIA

A Deus, por me conduzir nesta jornada da vida. Ao meu esposo e filho, pela compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, soberano, por me dar forças para enfrentar e vencer todos os desafios da vida, sempre.

Gostaria de agradecer por ter "nascido cientista", por ter tido uma infância adubada pela curiosidade e pelo estímulo do pai que não teve estudo, mas que apostou tudo na filha... Que ensinou a reconhecer as serpentes peçonhentas, que contava histórias sobre a Amazônia que conheceu e onde contraiu malária (e quase bateu as botas!). Aqui, com certeza, nasceu meu gosto pela imunoparasitologia! Meus profundos e eternos agradecimentos ao meu maior Professor, meu pai, Carlos Roberto Panis. Agradeço à minha mãe, Sueli, que me ensinou a nunca desistir, a correr atrás dos meus sonhos e que talvez seja a pessoa que mais acredite em mim. Agradeço a você mãe, por me ensinar os sentimentos mais nobres do ser humano e os verdadeiros valores da vida. Obrigada aos meus irmãos, Tuco, Beto, Cris e Bilu, pelo convívio, incentivo e admiração. Ao meu esposo e meu filho, agradeço pela compreensão por todas as noites em que tive que chegar tarde por causa dos experimentos, por todos os finais de semana em que me ausentei para cuidar dos animais, por nunca reclamar quando eu chegava com cheirinho de biotério... Obrigada pelo amor incondicional e pelo apoio, sem vocês eu jamais teria conseguido. Amo muito todos vocês!

Agradeço pelos obstáculos que me foram impostos por Deus para que eu crescesse como ser humano e, por nos momentos mais difíceis, colocar as pessoas certas no nosso caminho. Quando decidi que ia largar tudo para correr atrás daquilo que eu realmente queria fazer, procurei o Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da UEL e me candidatei à vaga do curso de mestrado, sem orientador definido. Foi onde teve início a minha história com meu orientador, Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, que não apenas aceitou me orientar como mestranda, mas que me ensinou muito da sua experiência de vida. Agradeço ao Prof. Phileno, meu pai científico a quem muito admiro, pela oportunidade de me tornar uma pessoa melhor, pelos ensinamentos, pela paciência nas horas difíceis, pela tolerância, pela compreensão, enfim por me trazer para a luz! Valeu PH!

Ao longo destes 10 anos de UEL, desde a graduação, fui agraciada pelo convívio com muitos cientistas e de cada um absorvi o máximo que pude; special thanks para

a Prof. Dra. Marta Marques de Souza, minha mãe científica, pela oportunidade de me desenvolver cientificamente na graduação; à Prof. Dra Edna Maria Vissoci Reiche, pelo convívio e pelos ensinamentos que me fizeram optar pela Imunologia; Prof. Dra Marli

Cardoso Martins Pinge pelos bons momentos de discussão sobre NO sintases e a sua família, pela compreensão nos momentos em que tivemos que dividir o tempo do chefe!!! Ao Dr. Rubens Cecchini, obrigada por compartilhar sua imensa sabedoria e me dar a oportunidade de me desenvolver enquanto aluna e por me aceitar como aluna do Doutorado em seu laboratório, muito obrigada.

À melhor equipe de laboratório com a qual já trabalhei até hoje: Vera Tatakihara e Vanessa Jacob Victorino. À Vera, por estar sempre à postos, sábados, domingos, feriados.... Devo muito á você, pois todas as oportunidades que tive desde que me formei tiveram um empurrãozinho seu... Valeu! Vanessa, minha irmã científica, meus braços direito e esquerdo!!! A única que resistiu a todos os experimentos, sem jamais desistir, sou sua fã menina! Obrigada de coração!

Muito obrigada aos colegas de turma, aos docentes do curso, aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas, em especial aos técnicos Zui e Pedrinho, obrigada pela paciência e pelos ensinamentos; ao Departamento de Patologia do Hospital Universitário, especialmente à Dra Tânia Mazzuco Longo e a técnica Lucia pelos ensinamentos e pela oportunidade de sempre aprender algo novo.

Agradeço ainda Prof. Dra Sueli Fumie Ogatta e Prof. Lucy Megumi, do Departamento de Microbiologia, por compartilhar seus conhecimentos e laboratório várias e várias vezes... Obrigada a todos estagiários do laboratório de Microbiologia e ao técnico Ediel por tudo. Pessoal do interlaboratório: S. Adernaldo, D. Irene e Mary, agradeço pelo auxílio na manutenção dos animais do biotério. Agradeço a CAPES/CNPq pelo financiamento do projeto.

E finalmente, a todos aqueles que participaram deste trabalho e que o tornaram possível, meus sinceros agradecimentos.

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo, e posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo-as todas, um dia vou construir um castelo..."

Fernando Pessoa

APOIO FINANCEIRO:

CAPES

FAEP/UEL

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA (EDITAL UNIVERSAL, PROCESSO 8427)

PANIS, Carolina. **Papel antagônico das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase infectados com trypanosoma cruzi.** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, o principal mecanismo efetor contra o parasita consiste na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados pelo IFN- γ , TNF- α e leucotrienos. Animais deficientes em óxido nítrico sintase induzível (iNOS) apresentam aumento da susceptibilidade à infecção, com elevada parasitemia e queda da sobrevida. Neste estudo, investigamos o papel das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase (5-LO) no curso da infecção aguda por *T. cruzi*. Camundongos isogênicos selvagens (129 WT) e nocautes para a produção de leucotrienos (5-LO^{-/-}) foram infectados intraperitonealmente com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas e tratados com inibidores farmacológicos para cNOS (L-NAME) e iNOS (aminoguanidina), 4 horas após início da infecção, durante 12 dias para obtenção das amostras de plasma e por 30 dias para avaliação da carga parasitária e sobrevida. Os parâmetros avaliados foram: determinação da carga parasitária, sobrevida, parasitismo cardíaco, produção de nitrito (como estimativa da produção de NO) plasmático e perfil de citocinas durante a infecção. Para determinação dos níveis de NO, realizou-se a adaptação, padronização e validação de uma técnica para dosagem de nitrito plasmático, partindo-se da desproteção das amostras e tratamento com esferas de cádmio sensibilizadas com cobre para conversão do nitrato a nitrito, com posterior detecção pela reação de Griess. Este micrométodo mostrou-se adequado e sensível para a detecção de nitrito em plasma e soro de camundongos, apresentando características como fácil execução, baixo custo e rapidez na obtenção de resultados. Em relação à infecção por *T. cruzi*, o bloqueio da iNOS com aminoguanidina promoveu aumento significativo da carga parasitária e redução da sobrevida em ambas linhagens de camundongos, sendo este efeito mais pronunciado nos animais nocautes para 5-LO, indicando que o controle da carga parasitária mediado pelo NO (via iNOS) é parcialmente dependente de leucotrienos. Neste estudo demonstrou-se pela primeira vez a participação da cNOS no controle da carga parasitária e a produção de NO na ausência da 5-LO durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*. O bloqueio com L-NAME levou à redução da carga parasitária sanguínea e cardíaca em relação aos animais infectados não tratados nas duas linhagens, sugerindo que a presença da cNOS exerce um efeito modulador favorável ao parasita. A iNOS é uma importante fonte de produção de NO durante a infecção, já que seu bloqueio provocou queda nos níveis de NO plasmático em ambas linhagens. O bloqueio da cNOS levou à redução da produção de NO apenas na ausência de 5-LO, indicando que a cNOS é uma importante fonte de NO na ausência de leucotrienos. O perfil de citocinas observado foi influenciado pela 5-LO, tanto nas condições basais como durante a infecção por *T. cruzi*. Adicionalmente, os resultados demonstram que o bloqueio das enzimas iNOS e cNOS promove alterações importantes nos níveis de citocinas dos padrões Th1 e Th2 produzidas na fase aguda da infecção. Finalizando, nossos dados evidenciam pela primeira vez a existência de ações antagônicas exercidas pelas enzimas iNOS e cNOS no circuito complexo formado por leucotrienos, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da infecção com o protozoário *T. cruzi*.

Palavras-chave: Patologia experimental. Doença de Chagas. Tripanosomatídeos

PANIS, Carolina. **Papel antagônico das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cnos) e induzida (inos) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase infectados com trypanosoma cruzi.** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

During *Trypanosoma cruzi* infection, causative agent of Chagas' disease, the major effector mechanism against parasite is the production of nitric oxide (NO) by IFN- γ , TNF- α and leukotrienes activated macrophages. Nitric oxide synthase (iNOS) knockout mice showed increased susceptibility to infection, high parasitemia and reduction of survival. In the present study, we investigated the role of nitric oxide synthase isoforms, cNOS (constitutive isoform) and iNOS (inducible isoform) in 5-lipoxygenase knockout mice (5-LO^{-/-}) during acute phase of *T. cruzi* infection. Isogenic wild type (129 WT) and knockout mice (5-LO^{-/-}, deficient in leukotrienes production) were infected intraperitoneally with 5×10^3 trypomastigotes forms and treated at different time intervals after *T. cruzi* infection with iNOS inhibitor (aminoguanidine) or cNOS inhibitor (L-NAME), initiated 4 hours after infection, during 12 days to plasma acquirement and 30 days to access blood parasitemia and survival rates. The parameters evaluated were: blood parasitemia, survival rates, cardiac parasitism, nitrite production (as estimative of NO levels) and cytokine profile. To determine NO levels, we adapted a method to detect nitrite in plasma, employing sample desproteinization and treatment with cadmium granules sensitized by copper to convert nitrate to nitrite and detect the formed product by Griess reaction. This micromethod showed adequability and sensitivity to detect nitrite levels in mice samples, also demonstrated that is fast (about 2 hours to perform 96 samples), easy, reliable, has low cost (because cadmium granules regenerate after use) and good sensitivity when tested in biological samples. During *T. cruzi* infection iNOS blockage showed an increase in blood parasitemia and reduction of survival rates in both mice, indicating that this isoform is necessary in parasite control. We showed for the first time cNOS participation in the course of infection. L-NAME treatment provoked reduction of blood parasitemia and number of amastigotes nests in all animals, suggesting that cNOS is an important mediator to the parasite burden during infection. iNOS is an important source of NO during infection because its blockage provoked reduction in NO levels to both mice strains. cNOS blockage decreased NO production, suggesting that cNOS is an important source of NO when leukotrienes are lacking. Cytokine profile was influenced by 5-LO in both basal levels and *T. cruzi* infection and the NOS inhibition promoted several changes in Th1/Th2 response during acute phase. Finally, our data showed for the first time antagonistic actions exerted by iNOS and cNOS in the complex leukotrienes, NO and pro-inflammatory cytokines circuit during acute phase of *T. cruzi* infection.

Keywords: Experimental pathology. Chagas disease. Trypanosomatids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese de leucotrienos a partir de lipídeos de membrana	30
Figura 2 – Esquema global das reações envolvidas na determinação de nitrito plasmático empregando-se o método de Cádmio-Cobre	36
Figura 3 – Modelo de distribuição da curva padrão e amostras em microplaca de 96 Poços	39
Figura 4 – Representação esquemática da placa de <i>Multi-Analyte Profiler ELISArray</i>	40
Figura 5 – Avaliação da produção de nitrito em função do tempo	44
Figura 6 – Rendimento da conversão de nitrato a nitrito	45
Figura 7 – Curva padrão de nitrito de sódio (NaNO ₂)	46
Figura 8 – Comparação da dosagem de nitrito no plasma pelo método de Griess associado ou não ao tratamento prévio da amostra com esferas de cádmio	49
Figura 9 – Parasitemia de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> , determinada pela metodologia de Pizzi e Brenner (1962)	52
Figura 10 – Sobrevivência de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> , infectados intraperitonealmente com 5x10 ³ formas tripomastigotas	53
Figura 11 – Quantificação do número de ninhos de amastigotas de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco de camundongos 129 WT e 5-LO ^{-/-} no 12 ^o dia pós-Infecção	54
Figura 12 – Produção de nitrito plasmático em camundongos selvagens (129WT) e <i>nocaut</i> para produção de leucotrienos (5-LO ^{-/-}) no 12 dia pós-infecção	56
Figura 13 – Perfil de citocinas em camundongos selvagens (129WT) e <i>nocaut</i> para produção de leucotrienos (5-LO ^{-/-}) no 12 ^o dia pós-infecção, tratados com Aminoguanidina.....	58
Figura 14 – Perfil de citocinas em camundongos selvagens (129WT) e <i>nocaut</i> para produção de leucotrienos (5-LO ^{-/-}) no 12 ^o dia pós-infecção, tratados com L-NAME	59
Figura 15 – Perfil de citocinas em camundongos selvagens (129WT) e <i>nocaut</i> para produção de leucotrienos (5-LO ^{-/-}) no 12 ^o dia pós-infecção, tratados com aminoguanidina e L-NAME	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

129 WT	linhagem de camundongo selvagem, controle de camundongos nocautes para 5-lipoxigenase
5-HEPETE	ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico
5-LO^{-/-}	linhagem de camundongo <i>nocaut</i> para 5-lipoxigenase
AG	aminoguanidina
BLT	receptores de leucotrienos transmembrana
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
COX	ciclooxigenase
Cys-LT	cisteinil leucotrienos
DC	doença de Chagas
DNA	ácido desoxiribonucléico
ERN	espécies reativas de nitrogênio
FLAP	proteína de ativação da 5-LO
GMP	guanidina monofosfato
IFN- γ	interferon gama
IL	interleucina
INF	infectado
iNOS	óxido nítrico sintase induzível KO - nocaut
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester LTA4 - leucotrieno A4
LTB4	leucotrieno B4 LTC4 - leucotrieno C4 LTs- Leucotrienos LXs - lipoxinas
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MRNA	RNA mensageiro
NF-κB	fator de transcrição nuclear kappa B
NK	célula natural killer
NO	óxido nítrico
NO₂	nitrito
NOS	óxido nítrico sintase
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	solução tampão fosfato
PGs	prostaglandinas
RNA	ácido desoxiribonucléico

TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TLRs	<i>toll like</i> receptors
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TXs	tromboxanas
WT	tipo selvagem (<i>wild type</i>)

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1	O CICLO BIOLÓGICO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DOENÇA DE CHAGAS (DC).....	15
1.2	DOENÇA DE CHAGAS HUMANA.....	18
1.3	DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO <i>T. cruzi</i>	22
1.3.1	Participação das Citocinas.....	22
1.3.2	Óxido Nítrico (NO) na DC.....	25
1.3.3	Eicosanóides.....	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	ANIMAIS E REAGENTES.....	33
3.2	INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	33
3.3	TRATAMENTOS.....	34
3.4	DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E TAXA DE SOBREVIVÊNCIA.....	35
3.5	PREPARO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	35
3.6	DETERMINAÇÃO DE NITRITO PLASMÁTICO COMO ESTIMATIVA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	35
3.6.1	Validação e Padronização da Técnica de Dosagem de Nitrito Utilizando-se o Sistema Cádmio-Cobre.....	35
3.6.1.1	Determinação do tempo médio de incubação.....	36
3.6.1.2	Rendimento percentual da conversão de nitrato a nitrito.....	37
3.6.2	Adaptação do Método de Dosagem de Nitrito Plasmático Utilizando-se o Sistema Cádmio-Cobre para Plasma de Camundongos.....	37
3.6.2.1	Processamento das amostras.....	37
3.6.2.1.1	<i>Desproteínização</i>	37
3.6.2.1.2	<i>Ativação dos grânulos de cádmio</i>	38
3.6.2.1.3	<i>Redução de Nitrato a Nitrito</i>	38
3.6.2.1.4	<i>Preparo da Curva Padrão</i>	38

	15
3.6.2.1.5 <i>Reação de Griess</i>	39
3.7 DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS	40
3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO E DETERMINAÇÃO DO PARASITISMO CARDÍACO	41
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 RESULTADOS	43
4.1 ADAPTAÇÃO, VALIDAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA DOSAGEM DE NITRITO PLASMÁTICO	43
4.1.1 Determinação do Tempo Médio de Incubação.....	43
4.1.2 Rendimento Percentual da Conversão de Nitrato a Nitrito	44
4.1.3 Curva Padrão de Nitrito.....	46
4.1.4 Adaptação do Método em Microplaca: Dados Complementares.....	47
4.1.5 Avaliação da Sensibilidade do Método de Dosagem de Nitrito Plasmático Utilizando-se o sistema Cádmio-Cobre em Relação à Reação de Griess.	48
4.2 5-LO PARTICIPA DO CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	49
4.3 EFEITOS ANTAGÔNICOS DO BLOQUEIO DA INOS E CNOS SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE CAMUNDONGOS 5-LO ^{-/-}	50
4.4 A PRODUÇÃO DE NO DURANTE A INFECÇÃO AGUDA POR <i>T. CRUZI</i> É DEPENDENTE DE INOS E CNOS, OCORRENDO NA AUSÊNCIA DE LEUCOTRIENOS	55
4.5 PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS	57
4.5.1 A Produção Basal de Citocinas Plasmáticas é Influenciada pela 5-LO.	57
4.5.2 A Infecção com <i>T. cruzi</i> Provoca Aumento dos Níveis de IL-6 e IFN- γ Plasmáticos.....	57
4.5.3 O Perfil de Citocinas Produzidas Durante a Infecção é Alterado pelo Bloqueio das NOS.....	57
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O CICLO BIOLÓGICO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* E DOENÇA DE CHAGAS (DC)

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um parasita hemoflagelado, pleomórfico, pertencente ao reino *Protozoa*, classe *Kinetoplastidea*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Estudos sobre as características biológicas deste parasita vêm sendo realizados há mais de um século, desde sua descoberta em mamíferos silvestres. Chagas (1909) relatou dimorfismo do parasita na corrente sanguínea destes animais, caracterizando a existência das formas tripomastigotas delgadas e formas largas que variam de acordo com a cepa do parasita e a fase da infecção.

As formas evolutivas do *T. cruzi* foram classificadas de acordo com a emergência do flagelo e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (NEWTON, 1968; DE SOUZA, 1984). São descritas as formas epimastigotas (flagelo e cinetoplasto anteriores ao núcleo, presentes apenas tubo digestivo do vetor e em meio de cultivo axênico), tripomastigotas (flagelo e cinetoplasto posteriores ao núcleo, formas infectantes presentes no sangue do hospedeiro vertebrado e em culturas de células), amastigotas (formas proliferativas no interior de células do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células, com pequeno flagelo) e esferomastigotas (no estômago do vetor) (BRENNER, 1973, SOUZA, 2000).

Devido às variações existentes em relação à severidade das infecções por *T. cruzi*, foram propostas diversas classificações filogenéticas (revisado por MOMEN, 1999) baseadas em marcadores enzimáticos e no DNA presente no cinetoplasto (DEVERA; FERNANDES; COURA, 2003). Atualmente, são descritas duas linhagens genéticas principais denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, biologicamente distintas e com ampla heterogeneidade gênica (FERNANDES et al., 1999). Estudos indicam que a infecção humana deve-se ao grupo II (cepas CL e Y) (GAUNT; MILES, 2000), enquanto o grupo I (cepas F, Tulahen, M226, Sylvio-X10, Dm28c, Dm30 e Guafitas) predomina no ciclo silvestre do parasita (RISSO et al., 2004).

Estruturalmente, os tripanossomatídeos apresentam uma superfície celular de composição variável conforme a forma evolutiva. A membrana celular é composta de bicamada lipídica, proteínas associadas e esteróis (SOUZA, 2000), como o ergosterol

(sintetizado pelo protozoário) e colesterol (captado no soro do hospedeiro), além da presença de uma mitocôndria, cinetoplasto e um flagelo altamente antigênico (BRENNER, 1973).

A utilização de culturas *in vitro* de *T. cruzi* em camadas de células tem permitido o estudo do processo de invasão, replicação e diferenciação do parasita (BURLEIGH; ANDREWS, 1995), contribuindo para o entendimento do seu ciclo de vida.

Inicialmente, a infecção por *T. cruzi* era transmitida na natureza através do ciclo silvestre entre triatomíneos e mamíferos (TEIXEIRA et al., 2001), mas devido à ocupação predatória do ambiente silvestre pelo homem transformou-se em uma antroponose, onde o homem e os animais domésticos constituíram o ciclo doméstico e peridomiciliar do parasita (FORATTINI, 1980).

Uma das principais formas de transmissão da DC é a vetorial, através de diferentes espécies de insetos hemípteros, conhecidos popularmente como barbeiros, pertencentes à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, gêneros *Triatoma ssp.*, *Panstrongylus ssp.*, e *Rhodnius ssp.*. As principais espécies transmissoras do *T. cruzi* no Brasil são o *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* e o *Panstrongylus megistus* (TOLEDO et al., 1997). Os triatomíneos são insetos ovíparos que depositam seus ovos em cavidades escuras no solo e paredes e após seu completo desenvolvimento em indivíduos adultos vivem por até 15 meses, podendo infestar rapidamente habitações precárias (BLITZMAN, 2007).

O ciclo biológico do *T. cruzi* tem início quando o vetor adquire o parasita durante o repasto sanguíneo através da ingestão de sangue do homem ou hospedeiros vertebrados infectados contendo as formas tripomastigotas infectantes. A picada do inseto é indolor e permite que o mesmo se alimente com aproximadamente 0,5 mL de sangue (LANA; TAFURI, 2005).

No estômago do vetor, ocorre a transformação destas formas em esferomastigotas e epimastigotas, que migram para o intestino, aderindo à superfície epitelial e multiplicando-se. Ao atingirem o reto, transformam-se em tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas juntamente com as fezes e urina do inseto triatomíneo (GARCIA; GONZALEZ; AZAMBUJA, 1999).

O ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado tem início quando o vetor elimina formas tripomastigotas nas fezes e urina durante seu repasto sanguíneo no homem e mamíferos. A saliva do inseto contém substâncias que desencadeiam resposta inflamatória local da picada que provocam sensação de prurido local (SOUZA, 2000) e levam o indivíduo

a coçar o local, arrastando as fezes contaminadas para o interior da porta de entrada criada na pele.

A invasão das células pelas formas tripomastigotas envolvem o reconhecimento inato do parasita através de padrões de seqüências moleculares associadas ao patógeno (PAMPs) por receptores do tipo *toll-like* do complexo TLR2 - TLR6 e TLR4 (GAZZINELLI; DENKERS, 2006), receptores NOD-like, helicases RIG-like (MEYLAN, TSCHOPP, KARIN, 2006) e receptores de manose (KAHN et al., 1996; MEIRELLES et al., 1999) que detectam a infecção e sinalizam entre a resposta imune inata e adaptativa (SABROE et al., 2008). Quando a infecção ocorre através da via oral, o processo de invasão é determinado pela expressão de glicoproteínas de superfície do parasita, como gp82, gp35/50 e gp90, que regulam a capacidade de invasão da mucosa gástrica em cada cepa do parasita (YOSHIDA, 2006; YOSHIDA, 2008).

Neste processo, ocorre adesão do parasita à superfície celular do hospedeiro através da interação com glicoproteínas de superfície, como o ácido siálico retirado do hospedeiro pelas transialidases expressas principalmente pelas formas metacíclicas (KAHN et al., 1996). O ácido siálico incorporado ao parasita facilita a interação, reconhecimento e entrada do mesmo na célula hospedeira, além de inibir a deposição da fração C3b do complemento e o seu reconhecimento do pelos fagócitos (SCHENKMAN et al., 1994).

Em seguida o parasita invade a célula num processo semelhante à endocitose, formando com a membrana celular o vacúolo parasitóforo (ANDRADE, 2000), evadindo-se da digestão celular em pH ácido pela secreção da proteína formadora de poros denominada Tc-Tox (ANDREWS, 1993; HYBISKE; STEPHENS, 2008) para o citoplasma da célula, onde sofre alterações bioquímicas que permitem sua transformação na forma amastigota citoplasmática (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

Inicia-se assim o ciclo de divisão intracelular, com duração de 4 a 5 dias, onde as formas amastigotas multiplicam-se e diferenciam-se em tripomastigotas, liberadas para a corrente sanguínea através do processo de ruptura celular para completar o ciclo evolutivo do parasita através da infecção de novas células (SOUZA, 2000). São liberadas aproximadamente 500 formas tripomastigotas por parasita interiorizado inicialmente (DVORAK, 1975).

A lise prematura de algumas células libera formas amastigotas capazes de invadir fagócitos, sobreviver à fagocitose e contribuir para a sustentação do ciclo de vida do parasita (FERNANDES et al., 2006). Estudos realizados em culturas de células revelaram que vários tipos celulares, fagocíticos ou não, podem ser infectados pelas formas metacíclicas

(BURLEIGH; ANDREWS, 1995), existindo um tropismo do parasita pelo tecido cardíaco (BRENNER, 1973).

1.2 DOENÇA DE CHAGAS HUMANA

As doenças tropicais negligenciadas caracterizam-se por uma série de infecções causadas por fungos, bactérias e parasitas e são apontadas como a principal causa de morbidade e mortalidade nas regiões menos desenvolvidas dos países pobres da América Latina. As principais doenças que se enquadram neste perfil são tricuriase, ascaridíase, ancilostomíase e doença de Chagas (HOTEZ et al., 2008).

A Doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose amplamente distribuída nas Américas e que tem como agente etiológico o protozoário *T. cruzi* (*Schizotrypanum cruzi*). Encontra-se distribuída por 18 países, do sul dos Estados Unidos até a Patagônia (CDC, 2007), onde existem de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e cerca de 100 milhões sob risco de contrair a doença, que responde por aproximadamente 20.000 mortes a cada ano, além do aparecimento de 50.000 novos casos na América Latina anualmente (HOTEZ et al., 2008).

Além dos números alarmantes para a saúde pública, na última década a DC foi considerada pelo Banco Mundial como a mais séria das doenças parasitárias da América Latina, apresentando um impacto socioeconômico maior do que a soma dos efeitos de todas as outras doenças parasitárias (DIAS et al., 2002), representando uma perda econômica aos países endêmicos de mais de seis bilhões de dólares por ano (DIAS et al., 1999).

No Brasil, a DC apresenta uma prevalência de 0,17% em crianças, totalizando cerca de 8 milhões de pessoas infectadas (DIAS, 1999). Registros oficiais de óbitos indicam que no Brasil ocorram aproximadamente 6000 mortes de pacientes chagásicos crônicos por ano (CHAPADEIRO, 1999) e redução aproximada de 9 anos na expectativa de vida de portadores crônicos (BLITZMAN, 2007).

A DC constitui um sério problema médico-social, ocorrendo principalmente em áreas rurais ou periurbanas onde prevaleçam condições precárias de habitação que permitam o contato entre o inseto vetor e o ser humano (SCHMUNIS, 2000; KROPF, 2005). Pode ser transmitida de diversas formas, sendo a transmissão vetorial a mais importante, já que responde por mais de 80% dos casos de infecção humana (DIAS et al., 1999). Outras

formas de infecção incluem transfusão sanguínea (15% dos casos), transmissão congênita (aproximadamente 4% dos casos), alimentos contendo fezes do inseto (transmissão oral), transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (DIAS, 2006; GIDDINGS et al., 2006).

A história natural da DC caracteriza-se pelo desenvolvimento de três formas clínicas evolutivas: forma aguda, forma latente ou indeterminada e forma crônica (CHAPADEIRO, 1999). A forma aguda inicia-se a partir da picada do inseto até aproximadamente 30 dias após (BLITZMAN, 2007) e caracteriza-se por infecção aguda generalizada por *T. cruzi*, com elevada parasitemia, grandes quantidades de amastigotas intrateciduals, infiltrado inflamatório tecidual abundante e lesão miocárdica intensa (RASSI et al., 2000).

A forma aguda afeta principalmente crianças e apresenta período de incubação de 5 a 14 dias e revela sintomas inespecíficos de início súbito (febre, calafrios, mal-estar, hepatoesplenomegalia) que nem sempre se manifestam e dificultam o diagnóstico da fase aguda da DC, impedindo o tratamento farmacológico que é eficaz somente nesta fase (NETO, 1998; DIAS, 1999).

Durante a fase aguda, é possível verificar-se em 4% dos casos a presença do sinal de Romanã, lesão caracterizada por reação de hipersensibilidade no complexo oftalmoganglionar que indica a porta de entrada da infecção. Cerca de 5% dos indivíduos infectados vão a óbito durante a fase aguda por morte súbita (ANDRADE, 2000), principalmente crianças, devido à falência cardíaca congestiva ou meningoencefalite (BLITZMAN, 2007).

Indivíduos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem uma resposta imunológica eficiente que reduz a parasitemia no sangue e tecidos, evoluindo cronicamente na forma indeterminada (assintomática) ou desenvolver sintomas cardíacos/digestivos (MARINHO et al., 1999).

A forma latente ou indeterminada, onde se encontram cerca de 60% das pessoas infectadas, caracteriza-se na fase crônica por um período assintomático que inicia semanas após a aquisição da infecção e estende-se com evolução benigna por muitos anos (BLITZMAN, 2007). Estudos longitudinais demonstram que aproximadamente 50% dos indivíduos infectados não apresentam sintomas clínicos (CHAPADEIRO, 1999), sendo que a maioria inexplicavelmente permanece nesta fase pelo resto de suas vidas sem desenvolver a doença (MACEDO, 1999). Pode ainda ocorrer reativação da fase aguda da DC em indivíduos imunossuprimidos, como transplantados ou infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (DIAS, 1999).

Após 10 a 30 anos de infecção, ocorrem os sintomas mais severos da doença, onde se observa comprometimento associado do aparelho digestório (10% dos casos) e, principalmente, do tecido cardíaco (13% dos casos), que contribui substancialmente para as altas taxas de morbidade e mortalidade por DC (MAGUIRRE et al., 1987; WANDERLEY et al., 1994; DIAS, 1999), caracterizando a forma crônica da doença.

Na fase crônica da doença, a forma cardíaca descrita inicialmente por Chagas e Vilella em 1922, é evidenciada pela cardiomiopatia inflamatória de evolução fatal, acompanhada clinicamente por arritmias, fenômenos tromboembólicos, insuficiência cardíaca congestiva e cardiomegalia. Ocorrem lesões no sistema de condução cardíaco, alterações vasculares e lesão apical que contribuem para a destruição progressiva do miocárdio (ANDRADE, 2000).

Os danos cardíacos observados na fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorrem principalmente devido ao rompimento dos ninhos de amastigota teciduais e pela liberação de antígenos que se ligam à superfície celular, a qual se torna alvo dos anticorpos produzidos contra o parasita. Na fase crônica, a auto-imunidade dos linfócitos T CD₄⁺ é apontada como causa da destruição cardíaca progressiva, além do envolvimento de diversos fatores como mimetismo molecular, apresentação de antígenos próprios e desregulação da resposta imune (SOARES; SANTOS, 1999).

O prognóstico da cardiopatia chagásica crônica depende do grau de comprometimento cardíaco, da cardiomegalia e do grau de insuficiência cardíaca, podendo ocorrer óbito por falência cardíaca ou morte súbita por bloqueio na condução do estímulo átrio-ventricular (BLITZMAN, 2007), além da redução da expectativa de vida para aproximadamente 60 anos de idade (MAGUIRRE et al., 1987). Mesmo após 100 anos da descoberta da DC, a cardiomiopatia chagásica crônica é descrita como a causa mais comum de miocardite em todo o mundo (MAGUIRRE, 2006).

A resposta imunológica gerada contra o parasita também promove lesões teciduais, associadas ao processo auto-imune de destruição do tecido cardíaco ou à produção de mediadores inflamatórios contra o parasita e seus antígenos teciduais (GIRONES; FRESNO, 2003).

No acometimento crônico do trato digestório, ocorrem alterações anatomopatológicas denominadas "megas", caracterizadas por distúrbios de deglutição (megaesôfago) e constipação (megacólon), decorrentes do comprometimento do sistema nervoso entérico, hipertrofia e inflamação teciduais. (ANDRADE, 2000).

O tratamento da DC constitui-se basicamente em terapêutica farmacológica específica contra o parasita, particularmente em casos agudos, congênitos, acidentes de laboratório e em casos crônicos de baixa idade e de infecção recente, além do tratamento sintomático durante o curso da infecção crônica (DIAS, 1999; BLITZMAN, 2007).

Existem duas drogas disponíveis para o tratamento específico da DC, o nifurtimox (Lampit®, Bayer Healthcare) e o benzonidazol (Rochagan®, Roche Pharmaceutical, cuja patente foi doada ao Ministério da Saúde, Brasil), com índice de cura que varia de 30 a 70%, dependendo da cepa do parasita (DIAS, 1999). Entretanto, devido à baixa especificidade da sintomatologia da DC na fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados não se trata a tempo e tornam-se portadores crônicos da doença (AMATO-NETO, 1998, CANÇADO, 2002).

Pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra o *T. cruzi* têm sido realizadas utilizando frações de DNA do parasita (FUJIMURA et al. 2001), terapia gênica (GARG, TARLETON, 2002) e tripanossomatídeos antígenicamente semelhantes (BASSO et al. 2004), com poucos resultados satisfatórios para ensaios clínicos em humanos.

Nos últimos anos, houve redução dos casos agudos de DC nos países do Cone Sul (SCHOFIELD et al., 1999), à medida que aumenta a prevenção da doença através da melhoria das condições de habitação, controle dos bancos de sangue e, principalmente, da erradicação dos vetores (DIAS et al., 1999). No Brasil de 1986 a 1996, houve redução de 96% no índice de infecção em crianças de 0 a 14 anos (BLITZMAN, 2007) e, em 2006, o Brasil foi certificado como área livre de transmissão da DC por *T. infestans*, considerado o principal vetor da doença (BRASIL, 2006).

Apesar da erradicação do vetor, atualmente a principal via de contágio por *T. cruzi* é a infecção oral, respondendo por mais de 50% dos casos agudos da DC na região amazônica, além dos surtos observados em Santa Catarina e no Pará ocorridos devido a ingestão de caldo de cana e açaí, respectivamente, contendo triatomíneos infectados (BRASIL, 2005).

Pode-se afirmar que a descoberta feita por Carlos Chagas compõe um dos episódios mais importantes da história da medicina. Ao longo do centenário da descoberta da DC, milhares de pesquisas foram e continuam sendo realizadas pela comunidade científica mundial, do âmbito molecular ao socioeconômico, na tentativa de propor soluções que melhorem as condições dos pacientes chagásicos. Somando-se a estes esforços, existe a necessidade da consolidação de estratégias preventivas, investimento maciço em pesquisa

básica e clínica e ações políticas governamentais para que mudanças reais neste cenário possam ser observadas num futuro próximo.

1.3 DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO *T. cruzi*

1.3.1 Participação das Citocinas

A primeira infecção experimental com o *T. cruzi* foi feita por Oswaldo Cruz, em 1909 (ANDRADE, 2008). O modelo murino tem sido o mais utilizado nos protocolos experimentais para estudo da DC (COSTA, 1999), já que a infecção chagásica experimental realizada em camundongos apresenta características similares à humana, com elevada parasitemia durante a fase aguda e presença de infiltrados parasitários no tecido cardíaco (BRENNER, 1973), sendo por isso amplamente utilizada como modelo para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da doença e resistência do hospedeiro (ALIBERTI et al., 1999).

Na maioria das vezes, a inoculação é feita pela via intraperitoneal, utilizando-se formas parasitárias tripomastigotas coletadas diretamente do sangue, das fezes do inseto vetor (triatomíneo) ou formas metacíclicas provenientes de meios de cultivo líquido ou em cultivos de células (ANDRADE, 2008).

A habilidade dos parasitas em sobreviver no hospedeiro depende de uma série de mecanismos envolvendo a relação parasita-hospedeiro, como capacidade de evasão, características do microrganismo e resposta imunológica. A evolução da infecção no modelo murino varia de acordo com a raça, idade, via de inoculação, cepa do parasita utilizada e sexo do hospedeiro (HAUSCHKA, 1974; ROWLAND et al., 1995; ROGGERO et al. 2002; TATAKIHARA et al., 2008).

As cepas de *T. cruzi* compõem uma população heterogênea, com efeitos biológicos distintos (BRENNER, 1973). A cepa Y, descoberta e isolada por Silva e Nussenzweig (1950), é altamente virulenta por ser capaz de levar à morte linhagens de camundongos susceptíveis inoculados intraperitonealmente por volta de 2 a 3 semanas de infecção. Estes parasitas têm um ciclo de vida constante, o que os torna bons modelos experimentais (PINTO et al., 1999). Apresenta tropismo por macrófagos esplênicos, fígado e

medula óssea, enquanto outras cepas infectam principalmente tecidos musculares (MELO; BRENNER, 1978).

Desde sua descoberta, a DC tem sido descrita como uma doença causada pelos danos gerados pela resposta inflamatória e imunológica à invasão dos tecidos por *T. cruzi* (COSTA, 1999). O perfil de resistência ou susceptibilidade ao *T. cruzi* no modelo murino depende, além das características do parasita, da imunidade inata e adquirida mediada por macrófagos, *natural killers* (NK), células T e linfócitos B (TARLETON, 1995; GAZZINELLI et al., 1998, LIEKE et al., 2006).

Também estão envolvidos na resposta ao parasita citocinas e mediadores inflamatórios produzidos durante a infecção (ABRAHANSON, 1998; PINGE FILHO et al., 1999; MICHAILOWSKY et al., 2001), com importância evidenciadas através de estudos realizados em camundongos nocautes (KO) e pelo emprego de inibidores farmacológicos de etapas responsáveis pela produção destas moléculas (MALVEZI et al., 2004; KOGA et al., 2006; BORGES, 2007).

O reconhecimento inato dos parasitas envolve o reconhecimento de PAMPs específicos através dos TLRs presentes nos macrófagos (HARRIS et al., 2006). Logo nas primeiras horas de infecção, os parasitas são fagocitados pelos macrófagos, induzindo uma resposta inata do organismo que desencadeia nas células NK a produção de interferon gama (IFN- γ), estimulando nos macrófagos a produção de citocinas pro-inflamatórias e mediadores com atividade tripanocida (CARDILLO et al., 2002).

O controle do parasitismo na fase aguda da DC depende basicamente da ação de citocinas sobre os macrófagos. Tratamento de macrófagos *in vitro* com citocinas do padrão Th1, como interferon gama (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF- α), resultam em morte eficiente das amastigotas intracelulares; já a adição de citocinas do padrão Th2, como o fator de crescimento tumoral (TGF- β) e interleucina 10, (IL-10) inibem a ação tripanocida de macrófagos ativados (ABRAHAMSON, 1998).

Durante a primeira semana de infecção, ocorre o estímulo para a produção e proliferação substancial de linfócitos e, ao mesmo tempo em que a IL-2 é produzida, seus receptores são expressos na superfície das células T (IL-2R) e liberados na sua forma solúvel (sIL-2R) (PAKIANATHAN; KUHN, 1992), sob forte influência de moléculas inflamatórias como os leucotrienos (MARCINKIEWICZ et al., 1997).

Em torno da segunda semana de infecção, ocorre um pico de imunossupressão, onde ocorre baixa produção de IL-2 (KIERZENBAUM; SZTEIN, 1994) e ausência de respostas proliferativas de linfócitos T frente à mitógenos, mediadas

principalmente pela produção de prostaglandinas (PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSON, 1999). Nesta fase, também é relatada a presença de fatores supressores do parasita, como glicoproteínas de membrana, proteínas secretadas pelo parasita e antígenos de superfície (SCHONECK et al., 1994; KIERSZENBAUM et al., 1999).

A produção inicial de IFN- γ pelas células NK é dependente da sua indução nos macrófagos estimulada pela IL-12 (ALIBERTI et al., 1996), num mecanismo dependente de IL-2 (SILVA; ABRAHAMSON, 2001). O papel da IL-12 no controle da infecção chagásica *in vivo* foi demonstrado através do tratamento de camundongos infectados com anticorpos anti IL-12, revelando altos níveis de parasitemia e mortalidade em relação aos controles. No mesmo estudo, o tratamento dos animais com anti-IFN- γ ou anti-TNF- α inibiu o efeito protetor da administração de IL-12 exógena (SILVA et al., 1998).

A administração de IL-12 em animais infectados leva à redução da parasitemia e queda da mortalidade, mediadas pelo aumento na produção de IFN- γ e TNF- α , indicando que esta citocina constitui um dos mecanismos de resistência à infecção por *T. cruzi* (HUNTER; SLIFER; ARAÚJO, 1996).

O IFN- γ é descrito como a principal citocina mediadora de resistência à infecção por *T. cruzi*, por induzir a ativação dos macrófagos e exercer papel central no controle sobre a carga parasitária através da produção de óxido nítrico (NO) (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994; CARDILLO et al., 1996). Um dos mecanismos envolvidos na resistência do hospedeiro induzida por IFN- γ na infecção é dependente de TLRs (KOGA et al., 2006), sendo sua produção inicial durante a fase aguda realizada por células NK (CARDILLO et al., 2002).

O primeiro estudo relatando o papel do TNF- α na infecção por *T. cruzi* foi realizado por Tarleton (1988), onde se demonstrou que o parasita é um potente indutor da produção desta citocina por macrófagos e células esplênicas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Posteriormente, o TNF- α foi associado à resistência à infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 1995) e descrito como fator de regulação negativa no processo de hematopoiese e desenvolvimento da anemia observada durante a fase aguda da infecção (MALVEZI et al., 2004).

Outra citocina pró-inflamatória, a interleucina 6 (IL-6), é uma citocina multifuncional que possui propriedades indutoras sobre a síntese de anticorpos em células B, síntese hepática de proteínas de fase aguda e diferenciação de linfócitos T citotóxicos (VAN SNICK, 1990). Estudos demonstram que durante a infecção *in vitro* com *T. cruzi* há produção de IL-6 por células endoteliais (TANOWITZ et al., 1992) e monócitos aderentes (VAN

VOORHIS, 1992); *in vivo*, os níveis de IL-6 elevam-se precocemente na fase aguda da infecção concomitantemente à produção de proteínas de fase aguda nos animais (TRUYENS et al., 1994; CARDONI *et al.*, 1997).

A participação da IL-1P como mediador pró-inflamatório durante a infecção está bastante relacionada ao desenvolvimento da atividade hipertrófica cardíaca em animais infectados por *T. cruzi* tanto nos estágios iniciais como na fase crônica da doença (PETERSEN; BURLEIGH, 2003).

Enquanto a IL-12, TNF- α e IFN- γ são descritos como mediadores de resistência à infecção, as citocinas predominantes no padrão Th2, como TGF- β e IL-10, estão associados à susceptibilidade (SILVA et al., 1998) por possuir propriedades inibitórias sobre a proliferação de células T, reduzir a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e a maturação de células dendríticas, necessários para a resposta à infecção por *T. cruzi* (TAYLOR et al, 2006). O TGF- β é descrito como a principal molécula capaz de controlar a produção de NO alterando o mecanismo pós transcricional da iNOS, desestabilizando seu mRNA, retardando a síntese da proteína funcional e acelerando sua degradação (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

Recentemente, Costa e colaboradores (2006) demonstraram que o interferon do tipo I (INF α e β) exerce um importante papel no controle da parasitemia na fase aguda da infecção, sendo este mecanismo mediado pela produção de NO.

1.3.2 ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA DC

A produção aumentada de IFN- γ e TNF- α durante a fase aguda da DC, induzem nos macrófagos através das vias JAK/STAT e NF- κ B a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma importante fonte de produção da molécula tripanocida óxido nítrico (NO) (XIE; WHISNANT; NATHAN, 1993).

O NO tem sido objeto de diversas pesquisas desde a descoberta de seus efeitos biológicos na década de 80 (FURCHGOTT; ZAWADSKI, 1980). É considerado um radical livre e atua como molécula mensageira em diversos processos fisiológicos, como regulação do tônus vascular e neurotransmissão, através do estímulo da síntese de GMP cíclico (BLOODSWORTH; O'DONNELL; FREEMAN, 2000). Seu envolvimento nos processos de agressão e defesa é descrito em diversas doenças (MORI; GOTOH, 2004).

A produção do NO é catalizada pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), divididas em constitutivas, cálcio-dependentes (cNOS, nNOS ou NOS I, eNOS ou NOS III) e induzível, cálcio independente (iNOS ou NOS II). As NOS oxidam a L-arginina como substrato para produção de L-citrulina e liberação da molécula de NO (BLOODSWORTH; O'DONNELL; FREEMAN, 2000). A molécula de NO é relativamente pequena e apresenta características lipofílicas, permitindo rápida difusão e reação com uma grande diversidade de estruturas biológicas intracelulares, metaloproteínas e outras moléculas de radicais livres (superóxido, radicais alcóxil e peróxil) (MAYER; HEMMENS, 1997).

As NOS estão presentes em células endoteliais vasculares, células cardíacas, plaquetas, células musculares lisas, células neuronais, macrófagos, células NK, fibroblastos e neutrófilos (MONCADA; HIGGS, 1991; LINDE et al., 2007). A manifestação de efeitos biológicos é dependente da química do ambiente e influenciada pela presença das diferentes espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas: ânion nitroxil, óxido nitroso, cátion nitrosil, ácido nitroso, dióxido de nitrogênio, dinitrogênio tetraóxido, peroxinitrito e cátion nitril, sendo que os principais produtos estáveis do metabolismo do NO são as moléculas de nitrito e nitrato (DENICOLA; SOUZA; RADI, 1998).

A variação nos níveis de NO são capazes de regular ativação e expressão da iNOS e cNOS. Concentrações fisiológicas de NO inibem a transcrição da iNOS através da inativação do NF- κ B, mantendo a atividade da cNOS (COLASANTI; PERSICHINI; MENEGAZZI, 1995; COLASANTI; SUZUKI, 2000). Entretanto, quando os níveis de NO se elevam, as moléculas não são suficientes para manter o NF- κ B suprimido, criando condições para superexpressão da iNOS (KANO; LEE; ZHANG, 2000).

A indução da expressão do mRNA da iNOS ocorre através da ação do fator de transcrição nuclear kappa (NF- κ B) sobre seu gene e é mediada por citocinas pró-inflamatórias (IL-1P, IL-6, TNF- α), processos infecciosos e LPS (MELDRUM, 1998; KELLY et al., 1996). A expressão da iNOS dependente de NF- κ B via estímulos inflamatórios requer uma inibição inicial da cNOS (PALOMBA et al., 2004), pois a produção de NO constitui um dos mecanismos de resistência à infecção por parasitas intracelulares que, paradoxalmente, contribui para os mecanismos imunopatológicos de diversas doenças (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). As lesões produzidas pelo NO dependem de sua combinação com outros radicais livres, como o ânion superóxido, produzindo uma espécie altamente reativa denominada peroxinitrito, capaz de ligar-se a estruturas celulares como proteínas e DNA (MALVEZI et al., 2004).

Estudos utilizando N-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) para bloquear a produção de NO via cNOS, demonstraram sua participação como reguladora negativa da migração e adesão leucocitária em modelos de isquemia e reperfusão (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991), evidenciando seu importante papel na estabilidade endotelial para contrapor a resposta inflamatória inicial (FARREL; BLAKE, 1996).

A participação do NO derivado das NOS constitutivas em processos patológicos é pouco conhecida, tendo sido descrita em modelos de doenças neurológicas (ZHENG et al., 1993). Já a produção de NO derivado da iNOS por macrófagos ativados é descrita como principal mecanismo microbicida em diversas infecções ocasionadas por patógenos intracelulares, como *Leishmania major*, *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (JAMES, 1991).

Durante a infecção por *T. cruzi*, o NO é descrito como o principal mecanismo efetor contra o parasita observado experimentalmente (TALVANI et al., 2002), já que a administração de inibidores da produção de NO (PETRAY et al., 1994) ou utilização de animais nocautes para iNOS (HOLSCHER et al, 1998; BORGES, 2007) levam ao aumento da parasitemia e redução da sobrevivência dos animais durante a fase aguda da DC.

Um dos principais inibidores empregados com a finalidade de bloquear a produção de NO derivado da iNOS é a aminoguanidina (AG), uma droga inativadora suicida que age preferencialmente sobre esta enzima. A AG mimetiza a L-arginina, substrato natural das NOS, sendo metabolizada pela enzima em um intermediário altamente reativo que ataca a estrutura enzimática causando sua inativação (LEE et al., 2005). No modelo de infecção por *T. cruzi*, a AG tem sido amplamente empregada para elucidar o papel do NO derivado da iNOS sobre diversos parâmetros envolvidos na infecção, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (VESPA et al, 1994; CUMMINGS; TARLETON, 2004).

A produção de peroxinitrito pelos macrófagos é capaz de levar formas tripomastigotas do parasita à morte e dificultar a motilidade, replicação e metabolismo energético das formas epimastigotas. Além disso, esta molécula é capaz de ocasionar a nitração de proteínas do parasita, agindo como um mecanismo antiparasitário (NAVILIAT et al.; 2005).

Por outro lado, o NO causa lesões celulares na membrana eritrocitária do hospedeiro (tanto a forma radical livre como o peroxinitrito), além de ocasionar um impacto negativo sobre o processo de hematopoiese durante o curso da infecção aguda (MALVEZI et al., 2004).

Como uma das principais características da DC é a infecção de células-alvo específicas, como os cardiomiócitos, a função normal do tecido cardíaco encontra-se comprometida ao longo da evolução da doença. Após invasão destas células pelo parasita, ocorre a liberação local de citocinas, induzindo a expressão da iNOS e produção de NO, com conseqüente disfunção cardíaca e cardiomiopatia (FICHERA et al., 2004; LINDE et al. 2007). Observa-se a superexpressão da iNOS nos cardiomiócitos desde o início da infecção e da cNOS nos primeiros 5 dias (CHANDRASEKAR et al., 2000).

Vespa e colaboradores (1994) investigaram a participação do NO no controle da parasitemia e sobrevida através do bloqueio farmacológico da iNOS em camundongos C57BL/6 e verificaram perda da resistência à infecção por *T. cruzi*, além da ação tripanocida *in vitro* deste mediador. Em contrapartida, Cummings e Tarleton (2004) relataram em seu estudo empregando animais nocautes para iNOS que estes animais apresentaram perfil de sobrevida semelhante aos animais selvagens e atribuem as diferenças observadas em relação à outros estudos à não especificidade dos bloqueadores de iNOS, que poderiam estar agindo simultaneamente no bloqueio das outras isoformas (também importantes para a produção de NO).

Existem relatos sobre a participação estágio-dependente do NO na DC, indicando que esta molécula só é necessária na fase aguda da infecção (SAEFTEL, BERNHARD, HOERAUF, 2001). Desta forma, são necessários estudos adicionais sobre o papel do NO no curso da infecção experimental por *T. cruzi*, bem como sobre a participação das diferentes fontes de produção de NO.

1.3.3 Eicosanóides

Os primeiros estudos que descreveram o papel das prostaglandinas (PGs) surgiram na década de 30 (KURZROK; LIEB, 1930; VON EULER, 1936; GOLDBLATT, 1937) através da observação do efeito do líquido seminal sobre a contractilidade uterina. Estudos posteriores demonstraram que estas substâncias estão presentes em todos os tecidos de diferentes organismos, desde as bactérias até os mamíferos (NOVERR et al., 2003). PGs, prostaciclina (PCs), tromboxanas (TXs), leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs) constituem o grupo das substâncias denominadas eicosanóides (RODRIGUES, 1992).

Os eicosanóides são produzidos por ação das ciclooxigenases (COX) ou da araquidonato 5-lipoxigenase (5-LO) sobre o ácido araquidônico da membrana plasmática, sob influência de estímulos fisiológicos e patológicos (SAMUELSSON et al., 1967; NUGTEREN et al., 1967).

As 5-LO constituem uma família de enzimas que oxidam ácidos graxos insaturados da membrana celular em hidroperóxidos bioativos e leucotrienos (BLOODSWORTH; O'DONNELL; FREEMAN, 2000), em questão de segundos a minutos (LEWIS et al., 1990).

A síntese de LTs a partir do ácido araquidônico (Figura 1) inicia-se a partir da ação da 5-LO sobre os lipídeos insaturados da membrana celular, originando o ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico (5-HPETE). A partir a ação conjunta com a proteína de ativação da 5-LO (FLAP), tem origem o leucotrieno A₄ (LTA₄), que rapidamente é convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) pela LTA₄ hidrolase ou conjugado com glutathione reduzida para formar leucotrieno C₄ (LTC₄) (AUSTEN, 2008).

A produção de LTs ocorre principalmente nos neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, basófilos e células dendríticas, sendo que as demais células possuem receptores para LTA₄ e realizam sua captação ou biossíntese transcelular (PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007).

A transcrição dos genes que regulam a biossíntese dos LTs é influenciada por citocinas (COWBURN; HOLGATE; SAMPSON, 1999), como TGF- β (SERIO et al., 2003) e IL-4 (HSIEH et al., 2001).

Os LTs são divididos em duas classes, os cisteinil leucotrienos (cys-LT) e o LTB₄. O LTB₄ exerce um potente efeito de quimioatração sobre polimorfonucleares e linfócitos T, causando a ligação entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo capazes de promover a regulação da resposta imunológica através da ativação e recrutamento dos leucócitos. Este efeito modulador imunológico e quimiotático do LTB₄ ocorre através da sinalização via moléculas de BLT1 e BLT2 (receptores transmembrana acoplados a proteína G) e pela indução do aumento na expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (QIU et al., 2006).

Os LTs participam de diversos processos patológicos como doenças inflamatórias (LEVY et al., 2001), processos alérgicos, câncer (PETERS-GOLDEN, HENDERSON, 2007) e doenças cardiovasculares (GHAZALPOUR et al., 2006). A participação destes mediadores no controle de processos infecciosos é descrita tanto para

parasitas extracelulares, como *Strongyloides stercoralis* (MACHADO et al., 2005), como intracelulares do gênero *Leishmania* (SEREZANI et al., 2006).

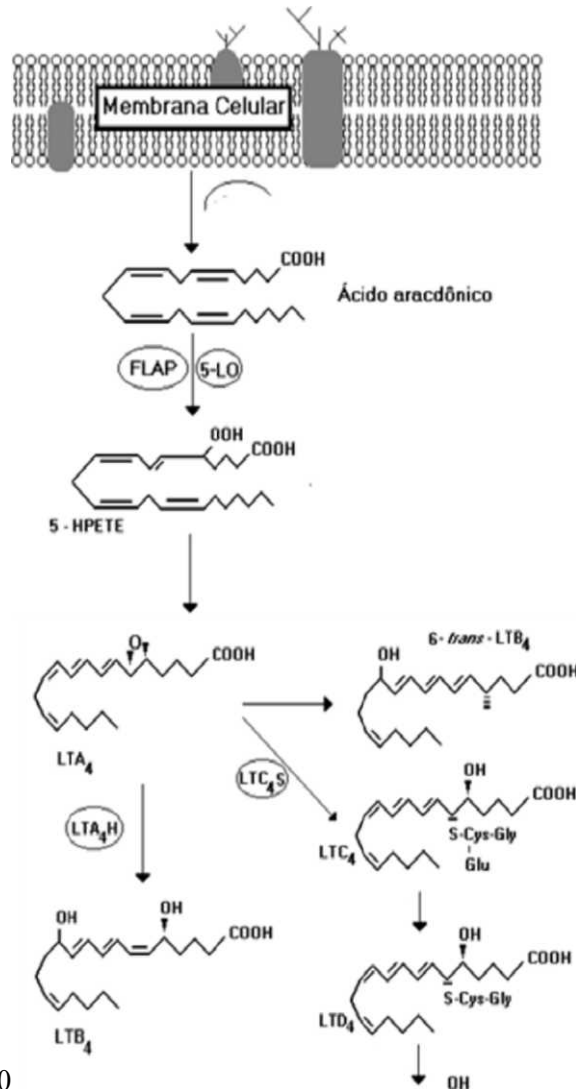


Figura 1 – Síntese de leucotrienos a partir de lipídeos de membrana. FLAP = proteína de ativação da 5-lipoxigenase, 5-LO = 5-lipoxigenase, 5-HPETE = ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico, LTA₄ = leucotrieno A₄, LTB₄ = leucotrieno B₄, LTC₄ = leucotrieno C₄, LTD₄ = leucotrieno D₄, LTE₄ = leucotrieno E₄.

Na década de 80, estudos revelaram o papel regulatório destes mediadores durante a infecção por *T. cruzi*. Inicialmente, foi relatada a ação de LTB₄ *in vitro* estimulando a fagocitose de macrófagos infectados com o parasita (WIRTH; KIERSZENBAUM, 1985). Aliberti e colaboradores (1999) demonstraram que moléculas quimioatratoras que atuam sobre receptores acoplados a proteína G, participam da cascata de eventos que desencadeia a produção de NO e morte do parasita. Mais tarde, os LTs foram descritos como mediadores de resistência à infecção *in vivo* por *T. cruzi* por induzir a produção de óxido nítrico nos

macrófagos infectados, concentração e tempo-dependente, desencadeada pelo aumento na expressão da iNOS (TALVANI et al., 2002).

Os LTs também desempenham papel regulador sobre a produção de algumas citocinas, direcionando o padrão de resposta imune para Th2 através do estímulo na produção de IL-10 e inibição da produção de IL-12 (SZCZEPAN et al., 2005). Na infecção por *T. cruzi*, o LTB4 é descrito como potente indutor da produção de TNF- α em macrófagos peritoniais murinos (TALVANI et al.; 2002). O papel dos LTs sobre a produção de outras citocinas e a inter-regulação entre estes mediadores na infecção por *T. cruzi* permanece pouco explorado.

Recentemente, nosso laboratório demonstrou a participação dos LTs no controle da carga parasitária, sobrevivência, parasitismo cardíaco e estresse oxidativo em camundongos selvagens (129 WT) e nocautes (5-LO⁻) infectados por *T. cruzi* durante a fase aguda (BORGES, 2007). Desta forma, para evidenciar as inter-relações existentes entre leucotrienos, óxido nítrico e citocinas, decidimos investigar o envolvimento da cNOS sobre o curso da infecção, produção de NO e perfil de citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Com base nos dados expostos, neste trabalho investigamos o papel das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase infectados com *T. cruzi*.

2.2 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

Avaliar o efeito do bloqueio da cNOS e iNOS em linhagens de camundongos isogênicos selvagens (129 WT) e nocautes (5-LO^{-/-}) durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (cepa Y) através dos seguintes parâmetros:

- Determinação da carga parasitária sanguínea,
- Determinação da taxa de sobrevivência dos animais;
- Determinação do parasitismo cardíaco;
- Dosagem de óxido nítrico plasmático;
- Quantificação de nitrito plasmático para estimativa da produção de NO durante a infecção;
- Dosagem de citocinas plasmáticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E REAGENTES

Foram utilizados camundongos 129 WT e 5 LO -/- (CHEN et al., 1994), isogênicos, com 8 a 12 semanas de vida. Os camundongos 5 LO -/- foram obtidos no Jackson Laboratory- USA e gentilmente cedidos pelo Dr. Fernando Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, em condições padronizadas dentro de gaiolas coletivas contendo no máximo 5 animais, com alimentação especial para camundongos (Nuvital CR1) e água esterilizada ad libitum.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (Processo 28568/05, CEEA 54/05) e estão de acordo com as recomendações do Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório.

Aminoguanidina (Sigma) e L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma) foram dissolvidos em solução tampão fosfato (PBS) pH 7.2 e NaCl 0.9%, respectivamente. Todas as soluções dos reagentes foram preparadas na hora da utilização sob condições estéreis.

3.2 INFECÇÃO POR T. CRUZI

A cepa Y do T. cruzi (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953), gentilmente cedida pelo Dr. Paulo Araújo do Departamento de Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, foi mantida por passagens semanais em camundongos isogênicos Balb/c através da injeção intraperitoneal de 2×10^5 formas tripomastigotas.

Para infecção dos grupos experimentais, foi coletado sangue de camundongos infectados anestesiados através de punção cardíaca. As formas móveis foram contadas em Câmara de Neubauer para determinação do inóculo de 5×10^3 , que foi injetado

intraperitonealmente nos animais dos grupos experimentais infectados.

3.3 TRATAMENTOS

O tratamento dos camundongos foi iniciado 4 horas após a infecção com *T. cruzi*. Durante 30 dias ininterruptos os animais dos grupos experimentais receberam injeções intraperitoniais diárias de tampão PBS contendo ou não os inibidores enzimáticos (listados no quadro 1). As doses de inibidores utilizadas basearam-se em protocolos descritos por estudos prévios que comprovaram sua eficácia (GARDINER et al., 1990, MARTINS et.al., 1999; MALVEZI et. al., 2004; MEHANNA et. al., 2007). Os grupos experimentais foram compostos de 3 a 5 camundongos e representativos de 3 a 6 experimentos distintos (variando conforme parâmetro analisado) e estão representados no quadro a seguir:

Quadro 1 – Inibidores, mecanismo de ação, doses diárias e grupos experimentais empregados para avali ação da participação das NOS na infecção aguda experimental por *T. cruzi*.

Inibidor	Mecanismo de ação	Dose diária	Grupos experimentais
Aminoguanidina	Inibição preferencial de iNOS	50 mg/Kg/dia	129 WT 129 5-LO -/-
L-NAME	Inibição preferencial de cNOS	20 mg/Kg/dia	129 WT 129 5-LO -/-

Legenda: iNOS (óxido nítrico sintase induzível), cNOS (óxido nítrico sintase constitutiva), 129 WT (animais selvagens, portadores de 5-lipoxigenase), 5-LO-/- (animais nocautes para 5-lipoxigenase), L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester).

3.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

A avaliação da concentração de parasitas circulantes nos grupos de animais infectados foi realizada através de contagem em microscópio óptico do número de parasitas circulantes em 5 μ L de sangue caudal heparinizado, alternadamente, a partir do 50 dia pós-infecção. Os resultados foram expressos em número de parasitas por mililitros de sangue, conforme descrito por Brener (1962). A taxa de sobrevivência dos animais infectados tratados ou não com inibidores foi avaliada durante 30 dias.

3.5 PREPARO E COLETA DAS AMOSTRAS

No 12º dia os animais foram anestesiados para coleta de sangue heparinizado por punção cardíaca. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para remoção cirúrgica do tecido cardíaco, que foi fixado em formalina tamponada para posterior análise histopatológica. O sangue total foi centrifugado a 1500 rpm/15 minutos/40C e o plasma obtido foi aliquoteado e estocado a -200C para posterior análise.

3.6 DETERMINAÇÃO DE NITRITO PLASMÁTICO COMO ESTIMATIVA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).

3.6.1 Validação e Padronização da Técnica de Dosagem de Nitrito Utilizando-se o Sistema Cádmio-Cobre.

Para estimativa da concentração de NO nas amostras, foi realizada a padronização e adaptação da técnica de determinação de nitrito em plasma humano descrita por Navarro-González e colaboradores (1998) para utilização de amostras biológicas de

camundongos e determinação simultânea de 40 duplicatas de amostras em microplaca. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes (Figura 2), com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550 nm (GRIESS, 1879).

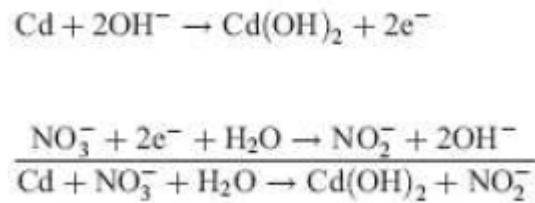


Figura 2 – Esquema global das reações envolvidas na determinação de nitrito plasmático empregando-se o método de Cádmio-Cobre seguido da reação de Griess.

3.6.1.1 Determinação do tempo médio de incubação

Foi realizada adaptação, validação e padronização da técnica para dosagem de nitrito plasmático descrita por Navarro-González e colaboradores (1998) em soro humano para plasma e soro de camundongos. Inicialmente, determinou-se qual o tempo médio de incubação das amostras com as esferas de cádmio ativadas a ser utilizado nesta reação, de forma a se obter o maior rendimento possível da conversão de nitrato a nitrito.

Para avaliar a produção de nitrito em relação ao tempo (em minutos) de uma solução de nitrato de sódio 50 μM a 25 $^{\circ}\text{C}$, incubou-se 300 μL da solução de nitrato sob agitação constante com esferas de cádmio previamente tratadas em tampão sulfato de cobre 5 mM, em diferentes tubos (um para cada tempo experimental). As amostras foram incubadas durante 90 minutos, com leituras para determinação da concentração de nitrito a cada 10 minutos, pela adição do reagente de Griess, com posterior leitura a 550 nm em espectrofotômetro e determinação das concentrações de nitrito utilizando-se curva padrão como referência.

3.6.1.2 Rendimento percentual da conversão de nitrato a nitrito

Para avaliar o rendimento da conversão de nitrato a nitrito neste sistema, foram preparadas soluções de nitrato de sódio com concentrações crescentes, de 0 a 250 μ M, a partir de uma solução estoque de 500 μ M.

Aliquotas de 300 μ L de cada solução foram incubadas com 400-600 mg de grânulos de cádmio previamente recobertos por sulfato de cobre 5 mM durante 10 minutos. Após incubação e retirada das esferas, adicionou-se 300 μ L de reagente de Griess, com posterior leitura a 550 nm em espectrofotômetro. Em seguida, as concentrações iniciais de nitrato das amostras foram comparadas à quantidade de nitrito produzida em cada uma delas.

3.6.2 Adaptação do Método de Dosagem de Nitrito Plasmático Utilizando-se o Sistema Cádmio-Cobre para Plasma de Camundongos.

Realizou-se a dosagem de nitrito plasmático para avaliar a sensibilidade da metodologia empregando o sistema cádmio-cobre em relação à reação de Griess. Animais C57BL/6, com 8 semanas de vida, foram anestesiados e puncionados na região cardíaca para coleta de sangue heparinizado. O plasma obtido foi desproteínizado e separado em 2 alíquotas, uma para a reação de Griess e outra para incubação com esferas de cádmio.

3.6.2.1 Processamento das amostras

3.6.2.1.1 Desproteínização

Para uso no ensaio, as amostras previamente coletadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo plástico de 1,5 mL, adicionou-se 60 μ L de amostra, 50 μ L de ZnSO_4 75mM (2,156g em 100mL H_2O deionizada) e, após homogeneização em vórtex (30 segundos), as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm a 4°C. Em seguida,

foram adicionados 70µL de 55mmol/L NaOH (220mg em 100mL H₂O destilada) e novamente homogeneizado em vórtex por 30 segundos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm a 4^oC, com posterior recuperação de 250 µL do sobrenadante, adicionando-se 50µL de tampão glicina-NaOH 45g/L pH 9,7 (4,5g em 100mL H₂O destilada).

3.6.2.1.2 Ativação dos grânulos de cádmio

Os grânulos estocados em H₂SO₄ 100mM foram lavados com H₂O destilada três vezes e, após, deixados em contato com solução de CuSO₄ 5mM (124,84mg em 100mL em tampão glicina-NaOH 15g/L pH 9,7) por 5 minutos. Os grânulos ativos foram utilizados dentro de 10 min e aqueles que ficaram pretos mesmo após serem lavados com H₂SO₄ foram descartados em recipiente apropriado para descarte de resíduos sólidos contendo metais pesados do Departamento de Química da UEL.

3.6.2.1.3 Redução de nitrato a nitrito

Foram adicionados 400 mg de grânulos de cádmio ativados (esgotados em papel de filtro para retirar o excesso de tampão CuSO₄) ao sobrenadante recuperado em tampão, deixando a mistura sob agitação contínua por 10 minutos. Após este tempo, as amostras foram transferidas para outro tubo, para determinação de nitrito por meio da reação de Griess.

3.6.2.1.4 Preparo da curva padrão

Solução estoque de 250 µM de NaNO₂ 100mM (69mg em 10mL H₂O destilada) foram preparadas no momento do uso e diluídas seriadamente até 7,8 até 125 µM na microplaca, conforme esquematizado abaixo.

<i>Ponto</i>	Concentração μM	Solução de NaNO₂	H₂O destilada (μL)	Volume final (μL)
<i>P1</i>	125	50 μL da solução estoque	50	100
<i>P2</i>	62,5	50 μL da solução P1	50	100
<i>P3</i>	31,25	50 μL da solução P2	50	100
<i>P4</i>	15,625	50 μL da solução P3	50	100
<i>P5</i>	7,8125	50 μL da solução P4	50	100
<i>Branco</i>	0	-----	100	100

3.6.2.1.5 Reação de griess

Para cada ponto de curva e amostra, foi feita a seguinte reação, em triplicata.

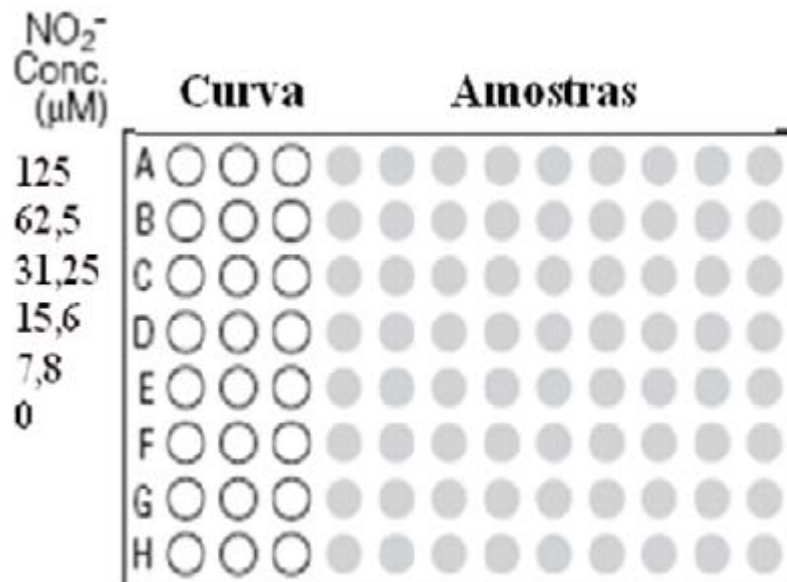


Figura 3 – Modelo de distribuição da curva padrão e amostras em microplaca de 96 poços.

Para cada poço, adicionou-se 50 μ L de amostra + 50 μ L de Reagente de Griess (Sulfanilamida: 0,4 g sulfanilamida em 20 mL Ácido Fosfórico 5% - proteger da luz; NEED, naftiletildietilamina: 40mg em 20mL H₂O destilada - protegido da luz). Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, e medida sua absorbância a 550 nm em leitor de microplaca.

3.7 DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS

Foi realizada dosagem das citocinas plasmáticas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-23, IFN- γ , TNF- α E TGF- β 1, utilizando-se o kit Multi-Analyte Profiler ELISArray® (Superarray Bioscience Corporation, CAT#1026 A). O kit foi desenvolvido para determinar simultaneamente o perfil de 12 citocinas dos padrões Th1/Th2/Th0/Th17, empregando-se o método de ELISA sandwich.

Utilizou-se pool de amostras de plasma obtidas dos grupos experimentais (3 a 5 animais por grupo), de 3 experimentos distintos, distribuídos em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com os anticorpos de captura específicos para cada anticorpo (Figura 4).

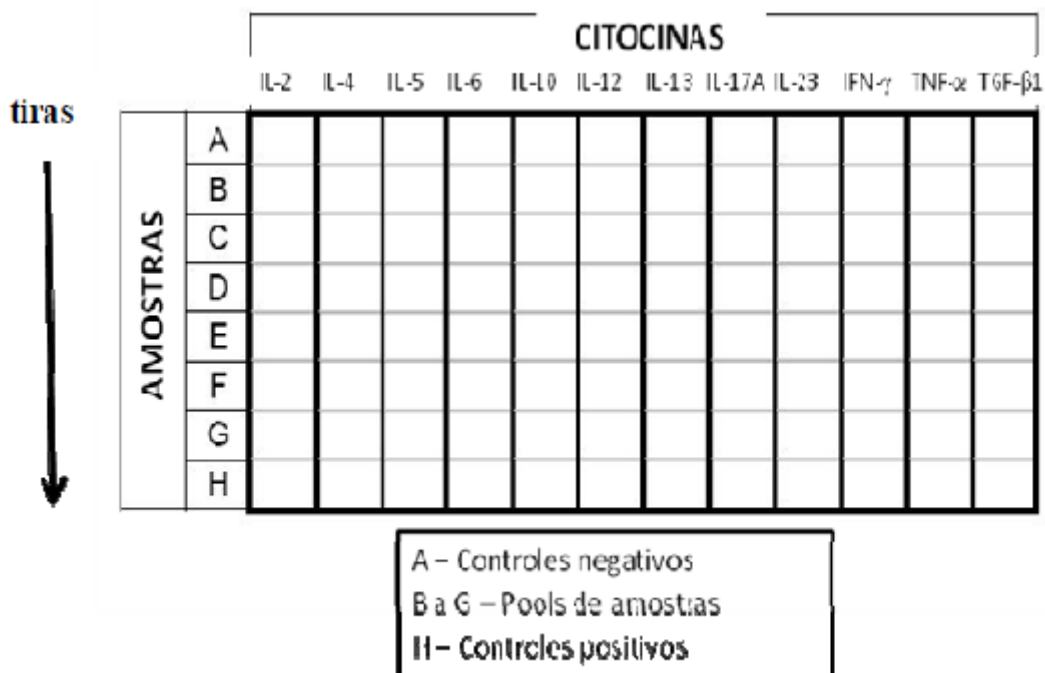


Figura 4 – Representação esquemática da placa de *Multi-Analyte Profiler ELISArray®*.

Para cada tira (strip) existem 8 poços previamente sensibilizados pelo fabricante com anticorpos de captura para cada citocina, havendo 12 tiras totais na placa, cada um correspondendo a uma citocina específica. Na linha A da placa foram adicionados os controles negativos e na linha H os controles positivos de cada citocina. Os controles positivos foram obtidos a partir da diluição de recombinantes e os controles negativos foram obtidos pela adição de tampão de diluição da amostra, fornecidos prontos pelo fabricante.

Nas linhas B a G, foram distribuídas as amostras em duplicata; portanto, para cada placa foi possível analisar o perfil de citocinas de 3 grupos experimentais. Após distribuição das amostras e controles nas respectivas tiras, a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente, lavada e incubada com as soluções de anticorpos de detecção por 1 hora a temperatura ambiente.

Após remoção da solução de anticorpos de detecção com tampão de lavagem, adicionou-se na placa solução contendo o complexo avidina-peroxidase, incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. Esta solução foi removida após a incubação por lavagem da placa e em seguida foi adicionada solução reveladora, incubada por 15 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, foi adicionada solução de bloqueio da reação, que desenvolveu coloração amarela. A absorbância das amostras foi determinada a 450 nm em leitor de microplaca, 20 minutos após adição da solução de bloqueio.

Os dados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias (D.O.), de acordo com os valores de absorbância obtidos.

3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO E DETERMINAÇÃO DO PARASITISMO CARDÍACO

O tecido cardíaco foi processado segundo o método de Preece para análise histológica (BEÇAK et. al., 1970). Foi realizada fixação em formalina tamponada 10%, desidratação do material em álcool (Biotec, Brasil), diafanização em xilol (Biotec, Brasil) e inclusão em parafina. O material foi seccionado em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Histocut 820) em cortes de 5 um e corados por hematoxilina- eosina.

Nas amostras de animais infectados (tratados ou não) foi realizada contagem do número de ninhos de amastigotas em microscopia óptica (400x) presentes na superfície total de cada corte, em triplicata.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados de 2 experimentos distintos e apresentados como média \pm SD e a comparação entre os grupos de animais infectados e controles foi realizada através do teste *t* de Student e ANOVA *one-way*, seguido do Teste de Bonferroni, utilizando o programa GrapPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), considerando-se $p < 0,05$ como significativo de diferença entre os grupos.

4 RESULTADOS

4.1 ADAPTAÇÃO, VALIDAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA DOSAGEM DE NITRITO PLASMÁTICO.

4.1.1 Determinação do Tempo Médio de Incubação

Foi realizada adaptação, validação e padronização da técnica para dosagem de nitrito plasmático descrita por Navarro-Gonzálvez e colaboradores (1998) em soro humano para plasma e soro de camundongos.

Inicialmente, determinou-se qual o tempo médio de incubação da amostras com as esferas de cádmio ativadas a ser utilizado nesta reação, de forma a se obter o maior rendimento possível da conversão de nitrato a nitrito.

Para avaliar a produção de nitrito em relação ao tempo (em minutos) de uma solução de nitrato de sódio 50 μ M a 25 ° C, incubou-se as soluções de nitrato sob agitação constante com esferas de cádmio previamente tratadas em tampão sulfato de cobre 5 mM. Para determinação da concentração de nitrito adicionou-se reagente de Griess, com posterior leitura a 550 nm em espectrofotômetro e determinação das concentrações de nitrito utilizando-se curva padrão como referência.

Observou-se que o primeiro pico de produção de nitrito atingido foi de 22 μ M aos 10 minutos de reação e que até 70 minutos de reação a conversão de nitrato a nitrito se manteve entre 20 e 28 μ M. Desta forma, o tempo médio de incubação da amostra com esferas de cádmio ativadas escolhido para todas as reações testadas neste trabalho foi 10 minutos (Figura 5).

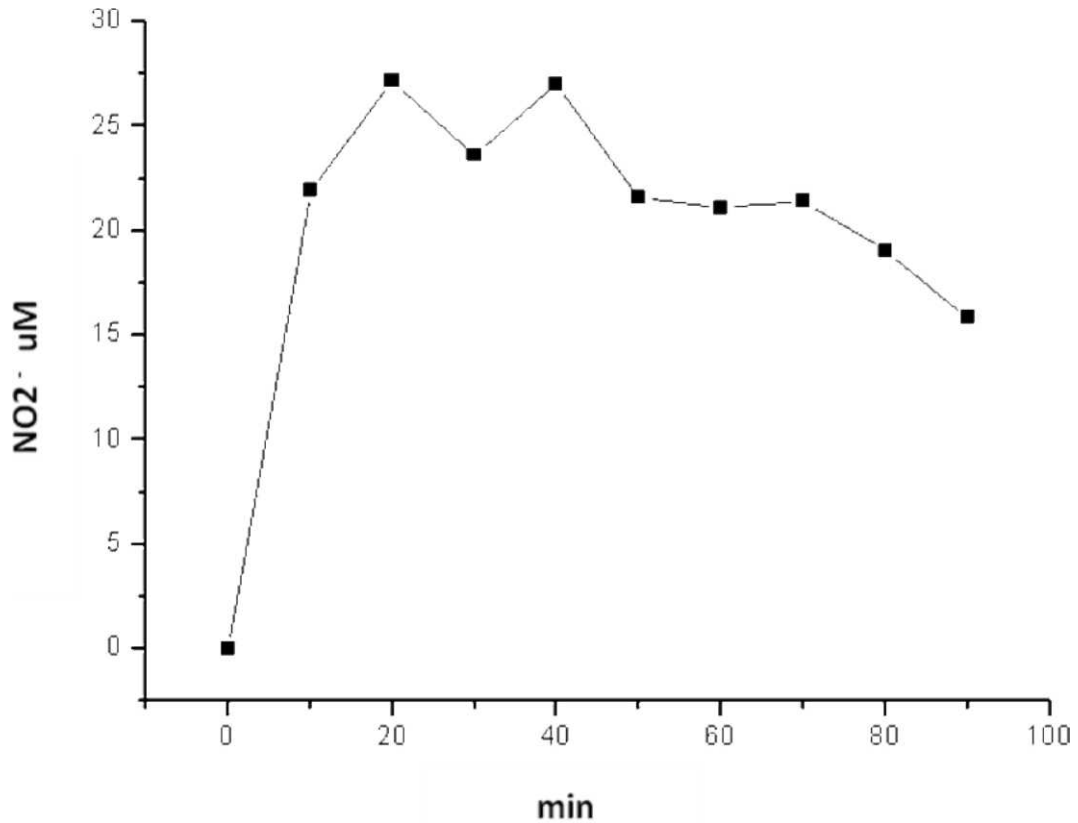


Figura 5 - Avaliação da produção de nitrito em função do tempo. Foi realizada a incubação de uma solução de nitrato de sódio 50 uM com esferas de cádmio previamente tratadas com tampão sulfato de zinco 5 mM em glicina 15 g/mL, pH 9.7. Para cada tempo testado foram utilizados tubos diferentes, as amostras permaneceram a 25 ° C, sob agitação constante. Para determinação da concentração de nitrito, adicionou-se reagente de Griess a cada tubo teste em proporções equivalentes ao volume de amostra, determinando-se em seguida a absorvância a 550 nm em espectrofotômetro. A concentração de cada amostra foi obtida a partir de uma curva padrão de NaNO₂. O gráfico expressa o resultado de um experimento representativo das análises.

4.1.2 Rendimento Percentual da Conversão de Nitrato a Nitrito

Para avaliar o rendimento da conversão de nitrato a nitrito neste sistema, foram preparadas soluções de nitrato de sódio com concentrações crescentes de 0 a 250 μM. Após incubação com grânulos de cádmio por 10 minutos, alíquotas da amostra foram adicionadas ao mesmo volume de reagente de Griess, com posterior leitura a 550 nm em espectrofotômetro.

Em seguida, as concentrações iniciais de nitrato das amostras foram comparadas à quantidade de nitrito produzida em cada uma delas. A figura 6 mostra a quantidade de nitrito produzida em cada solução de nitrato de sódio testada. Observa-se que

até o ponto onde adiciona-se 60 μM de nitrato, ocorre uma conversão do mesmo em nitrito que varia entre 5 μM e 20 μM . Após este ponto, a produção de nitrito em cada solução de nitrato passou a equivaler aproximadamente a metade da concentração desta solução. O rendimento médio calculado para esta conversão foi de 53,09%.

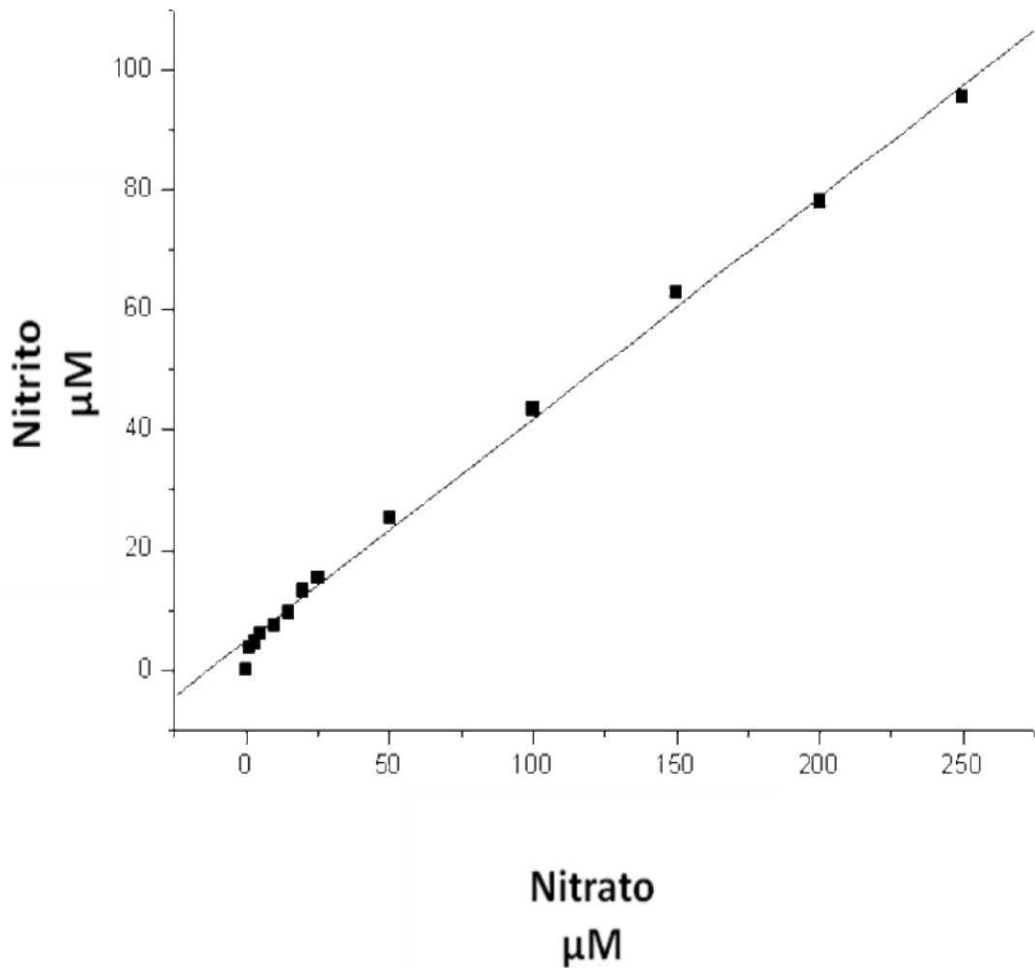


Figura 6 – Rendimento da conversão de nitrato a nitrito. Partindo-se de concentrações crescentes de nitrato de sódio (0 a 250 μM), incubou-se as soluções com esferas de cádmio previamente sensibilizadas com tampão sulfato de zinco 5 mM em glicina 15 g/mL, pH 9.7. Para cada concentração testada as amostras permaneceram a 25 $^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante. Para determinação da concentração de nitrito, adicionou-se reagente de Griess a cada tubo teste em proporções equivalentes ao volume de amostra, determinando-se em seguida a absorbância a 550 nm em espectrofotômetro. A concentração de cada amostra foi obtida a partir de uma curva padrão de NaNO_2 . Em seguida, calculou-se o rendimento percentual da conversão de nitrato a nitrito em cada ponto. O gráfico expressa o resultado de um experimento representativo das análises. O gráfico expressa o resultado de um experimento representativo das análises.

4.1.3 Curva Padrão de Nitrito

Para determinar a concentração de nitrito das amostras, utilizou-se uma curva padrão de nitrito de sódio. Os pontos foram obtidos através de diluições de uma solução estoque de NaNO_2 na concentração de 250 μM , diluída seriadamente de 125 μM a 7,8 μM , utilizando-se como branco da reação água miliQ. Em seguida, adicionou-se volume equivalente de reagente de Griess a todos os poços, com leitura a 550 nm em espectrofotômetro após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, protegido da luz.

A figura 7 mostra a correlação entre os valores das absorbâncias a 550 nm (O.D.) e a concentração de nitrito presente em cada ponto da curva, que posteriormente foi utilizada para determinação da concentração das amostras testadas através da regressão linear dos pontos e obtenção da equação da reta. Para cada reação, foi preparada uma nova solução estoque e uma curva padrão.

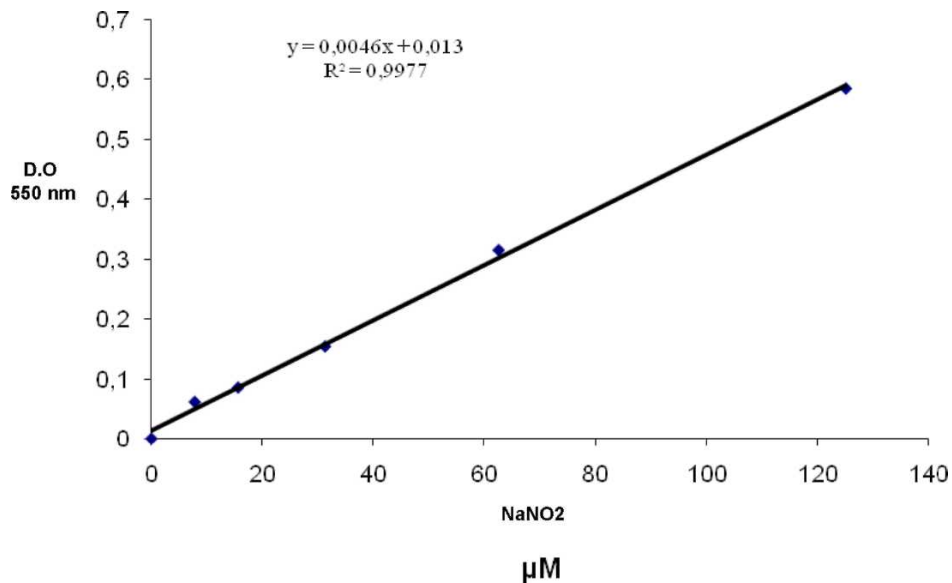


Figura 7 – Curva padrão de NaNO_2 . Para determinar a concentração de nitrito das amostras, utilizou-se uma curva padrão de nitrito de sódio, a partir da diluição seriada da solução estoque de NaNO_2 250 μM . Após adição do reagente de Griess, determinou-se a absorbância a 550 nm em espectrofotômetro, expressa no gráfico como D.O. A equação da reta foi obtida a partir da regressão linear dos pontos. O gráfico expressa o resultado de um experimento representativo das análises.

4.1.4 Adaptação do Método em Microplaca: Dados Complementares

O método descrito por Navarro-González e colaboradores (1998) executa todo o protocolo experimental em tubos de ensaio, empregando um volume inicial de amostra de 300 μ M, obtendo-se um volume final de reação de 2.700 μ L. A adaptação deste método para a microplaca de 96 poços consistiu na utilização de um volume de amostra de 60 μ L, obtendo-se um volume final de reação de 500 μ L, reduzindo em 6 vezes o volume necessário de amostra e reagentes (Tabela 1).

Além de reações com plasma de camundongos, também foram testadas reações de soro obtendo-se os mesmos resultados. Utilizando-se a alíquota de 60 μ L de plasma, obteve-se a possibilidade de trabalhar em quadruplicata de cada amostra. O tempo de execução do teste em microplaca, considerando-se a utilização de 96 poços foi de 2 horas, permitindo a análise de pelo menos 28 amostras, simultaneamente à curva padrão. A linearidade do teste foi observada entre 0 e 500 μ M.

A imprecisão intra-ensaio (*within-run*) foi realizada através da repetição de 10 vezes a mesma amostra, dentro do mesmo teste e a imprecisão inter-ensaio (*betwen-day*) pela repetição de uma amostra em 10 reações distintas executadas em dias diferentes. O principal interferente identificado durante a adaptação e padronização do teste foi a hemólise, que elevou as concentrações de nitrito nas amostras. Desta forma, todas amostras hemolisadas obtidas nos testes biológicos foram desconsideradas para esta análise.

Tabela 1 – Dados complementares obtidos a partir da padronização em microplaca do método descrito por Navarro-González e colaboradores (1998) para determinação da concentração de nitrito plasmático.

Parâmetros	Resultados
Volume de amostra inicial	60uL
Tipo de amostra	Plasma, soro
Número de repetições por alíquota de amostra	quaduplicata
Volume de reagente de Griess por poço	50 uL
Tempo de execução aproximado (96 poços)	2 horas
Intervalo e linearidade do teste (NaNO ₂)	0 - 500 uM (R=0,99825±0,000957, n=8)
Rendimento médio da conversão nitrato-nitrito	53,09%
Tempo médio da conversão nitrato-nitrito	10 minutos, estável por 70 minutos a 25 ^o C
Imprecisão intra-ensaio	4,16%± 0,002, n=10
Imprecisão inter-ensaio	6,22%±0,005, n=10
Interferentes identificados no teste	Hemólise

4.1.5 Avaliação da Sensibilidade do Método de Dosagem de Nitrito Plasmático Utilizando-se o sistema Cádmio-Cobre em Relação à Reação de Griess.

Realizou-se a dosagem de nitrito plasmático para avaliar a sensibilidade da metodologia empregando o sistema cádmio-cobre em relação à reação de Griess. Camundongos C57BL/6 (n=10), com 8 semanas de vida, foram anestesiados e puncionados na região cardíaca para coleta de sangue heparinizado. O plasma obtido foi desproteínizado e separado em 2 alíquotas, uma para a reação de Griess e outra para incubação com esferas de cádmio.

De acordo com a figura 8, a dosagem de nitrito plasmático nas amostras que receberam apenas o reagente de Griess foi de 1,87±0,6 μ M, n=8, enquanto que os plasmas tratados com esferas de cádmio sensibilizadas com cobre revelaram níveis de nitrito de 11,4±1,28, n=10. Assim, o aumento na sensibilidade de detecção do nitrito observada empregando-se o tratamento da amostra com as esferas de cádmio foi 6 vezes maior em relação à reação empregando apenas o reagente de Griess.

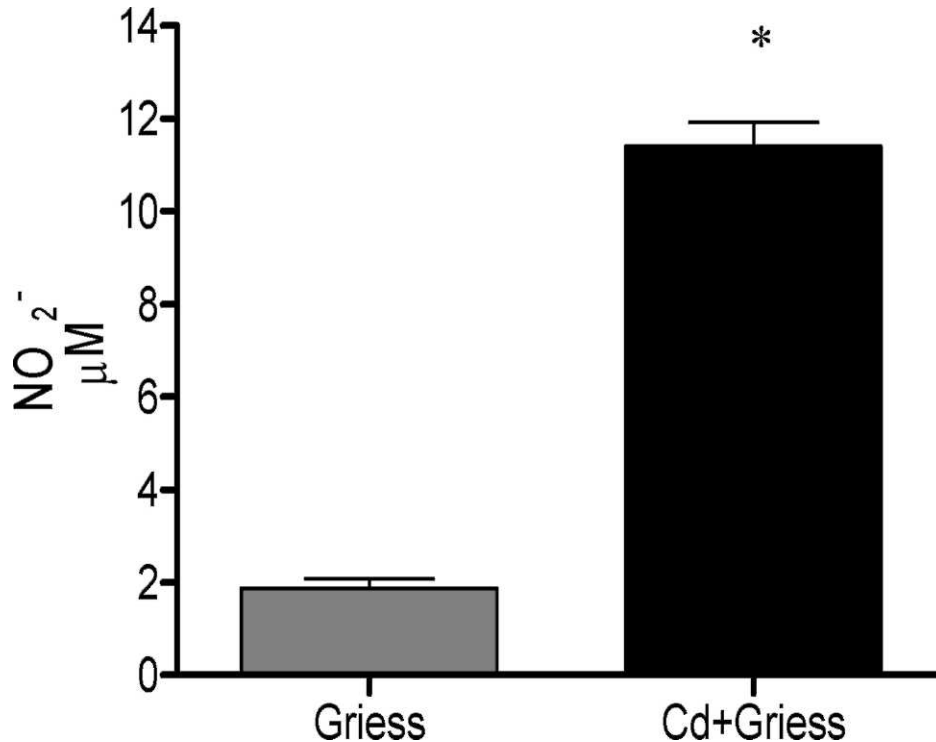


Figura 8 – Comparação da dosagem de nitrito no plasma pelo método de Griess associado ou não ao tratamento prévio da amostra com esferas de cádmio. Plasma desproteínizado de animais controle C57BL/6 foi adicionado ao reagente de Griess apenas (Griess) ou sofreu tratamento com esferas de cádmio sensibilizadas com cobre e posterior adição ao reagente de Griess (Cd+Griess). As concentrações de nitrito foram determinadas após leitura a 550 nm, empregando-se curva padrão como referência. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,0001$, teste T de Student).

4.2 5-LO PARTICIPA DO CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A INFECÇÃO POR *T. CRUZI*

Para avaliar o curso da fase aguda da infecção chagásica experimental, utilizamos duas linhagens de camundongos susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (cepa Y), 129 WT (linhagem selvagem) e 5-LO^{-/-} (nocautes para 5-lipoxigenase, deficiente na produção de leucotrienos), tratadas ou não com os inibidores da produção de NO, L-NAME (para inibição da cNOS) e aminoguanidina (para bloqueio da iNOS).

A figura 9 mostra o curso da infecção nestes animais, infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* intraperitonealmente. O pico de infecção ocorreu por volta do sétimo dia em ambas as linhagens (129 WT e 5-LO^{-/-}) infectadas sem tratamento (INF) e os animais nocautes para 5-LO apresentaram maiores níveis de parasitemia ao longo da

infecção, reduzindo o número de parasitas circulantes posteriormente ao grupo selvagem ao longo da infecção.

Em relação à sobrevivência dos animais, observou-se que todos os animais selvagens sem tratamento (129 WT, Figura 10A) sobreviveram até o trigésimo dia de infecção, sendo que 60% dos animais da linhagem nocaute (5-LO^{-/-}) foram a óbito dentro deste período (Figura 10B), evidenciando a participação da 5-LO na sobrevivência e resistência à infecção por *T. cruzi*.

O parasitismo cardíaco dos animais 5-LO^{-/-} (Figura 11) revelou uma contagem do número de ninhos de amastigotas 4 vezes maior em relação aos animais selvagens (13,66±1,56 *versus* 3,32±0,51), indicando que o controle do número de ninhos e multiplicação do parasita no tecido cardíaco está associado à presença da 5-LO.

4.3 EFEITOS ANTAGÔNICOS DO BLOQUEIO DA iNOS E CNOS SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE CAMUNDONGOS 5-LO^{-/-}

Corroborando achados demonstrados em estudos anteriores, nossos dados evidenciam a participação da iNOS ao longo da infecção aguda por *T. cruzi*, demonstrada através da utilização de bloqueio farmacológico desta enzima. Os animais receberam a primeira dose de inibidor 4 horas após a infecção e o tratamento foi mantido durante 30 dias, para avaliação da taxa de sobrevivência e parasitemia. O grupo de animais controle recebeu injeção intraperitoneal de tampão PBS (INF) e o grupo experimental recebeu injeção de aminoguanidina (AG, 50 mg/kg/dia). Observou-se elevação do número de parasitas no tratamento com aminoguanidina (AG) nas duas linhagens (Figura 9).

Em relação à sobrevivência, o tratamento com aminoguanidina provocou a morte de 50% dos animais 129 WT até o 28^o dia após a infecção; já nos animais nocautes, observou-se início dos óbitos no 22^o dia e morte de 100% do grupo até o trigésimo dia (Figura 10).

A contagem do número de ninhos no tecido cardíaco (Figura 11) no grupo tratado com aminoguanidina revelou aumento do parasitismo cardíaco em ambas as linhagens de maneira semelhante (28,33±4,33 para os animais selvagens e 33,01±10,81 nos camundongos nocautes), demonstrando que a 5-LO não participa deste processo na ausência de iNOS.

Para avaliar a participação da cNOS no curso da infecção aguda por *T. cruzi*, os animais receberam injeção de L-NAME (20 mg/kg/dia) durante 30 dias. Observou-se que o bloqueio da cNOS provocou queda do número de parasitas nos animais de ambas linhagens (Figura 9 A e B) e que, para os animais nocautes, este tratamento decresce o número de parasitas na circulação a níveis indetectáveis. A sobrevida dos animais selvagens (Figura 10) tratados com L-NAME é de 90% ao final de 30 dias e, para a linhagem 5-LO^{-/-}, o tratamento com L-NAME provocou a morte de 100% dos animais dentro de 22 dias.

Demonstrou-se que o bloqueio da cNOS proporciona o controle do parasitismo cardíaco nos animais nocautes para 5-LO, pois o tratamento com L-NAME provocou redução significativa do número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco. Os animais selvagens tratados com L-NAME não apresentaram alterações na contagem de ninhos cardíacos (Figura 11).

Para avaliar o efeito conjunto da iNOS e cNOS sobre a infecção, os grupos experimentais receberam injeções simultâneas de aminoguanidina e L-NAME. Observou-se que o tratamento com aminoguanidina + L-NAME (AG+LNAME) levou ao aumento da carga parasitária apenas na linhagem 129 WT, com novo pico ao 17^o dia, provocando redução do número de parasitas na linhagem nocaute até o 11^o dia e elevação da carga parasitária a partir do 13^o dia (Figura 9). O efeito deste bloqueio simultâneo sobre a taxa de sobrevivência dos animais selvagens não provocou redução significativa da sobrevida, enquanto que a linhagem nocaute apresentou 100% de óbitos no 17^o dia (Figura 10). O parasitismo cardíaco apresentou queda significativa nos animais com o bloqueio simultâneo das NOS, independentemente da presença de leucotrienos (Figura 11).

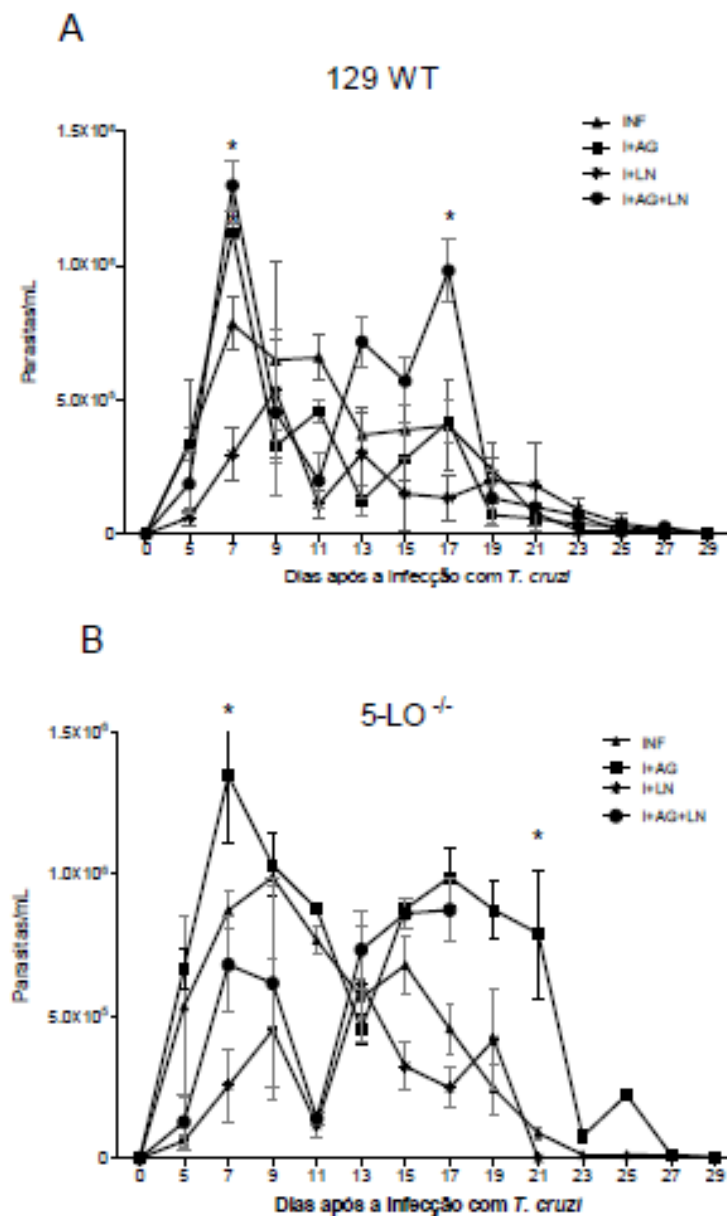


Figura 9 – Parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*, determinada pela metodologia de Pizzi e Brenner (1962). A parasitemia foi quantificada através do número de formas tripomastigotas/mL de sangue total. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão, representativos de 5 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ indica resultados estatisticamente diferentes. INF=animais infectados, I+AG=animais infectados tratados com aminoguanidina, I+LN=animais infectados tratados com L-NAME, I+AG+LN=animais infectados tratados com aminoguanidina e L-NAME.

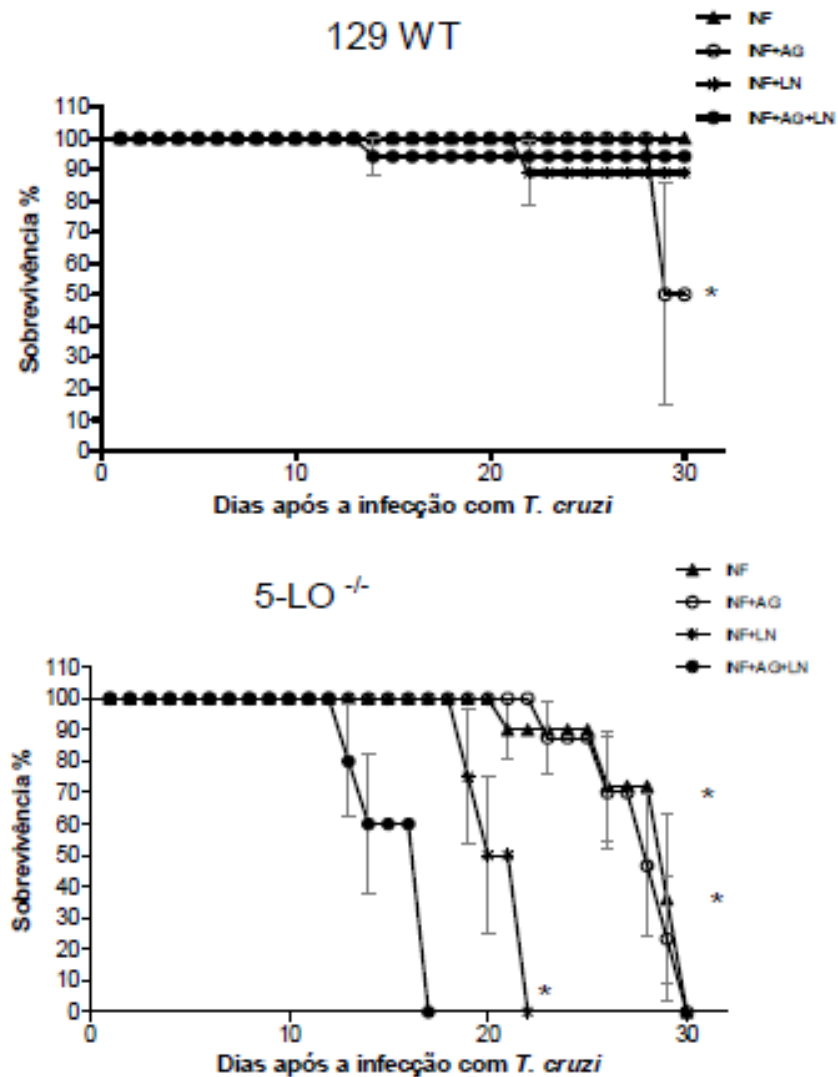


Figura 10 – Sobrevivência de camundongos infectados com *T. cruzi*, infectados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas. Os tratamentos foram iniciados 4 horas após a infecção e mantidos durante 30 dias. Os tratamentos administrados nos animais foram injeção de tampão PBS (INF), aminoguanidina 50 mg/kg/dia (AG), L-NAME 20 mg/kg/dia ou aminoguanidina + L-NAME (AG+L-NAME). Os resultados foram expressos como média±desvio padrão, representativos de 5 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ indica resultados estatisticamente diferentes. INF=animais infectados, I+AG=animais infectados tratados com aminoguanidina, I+LN=animais infectados tratados com L-NAME, I+AG+LN=animais infectados tratados com aminoguanidina e L-NAME.

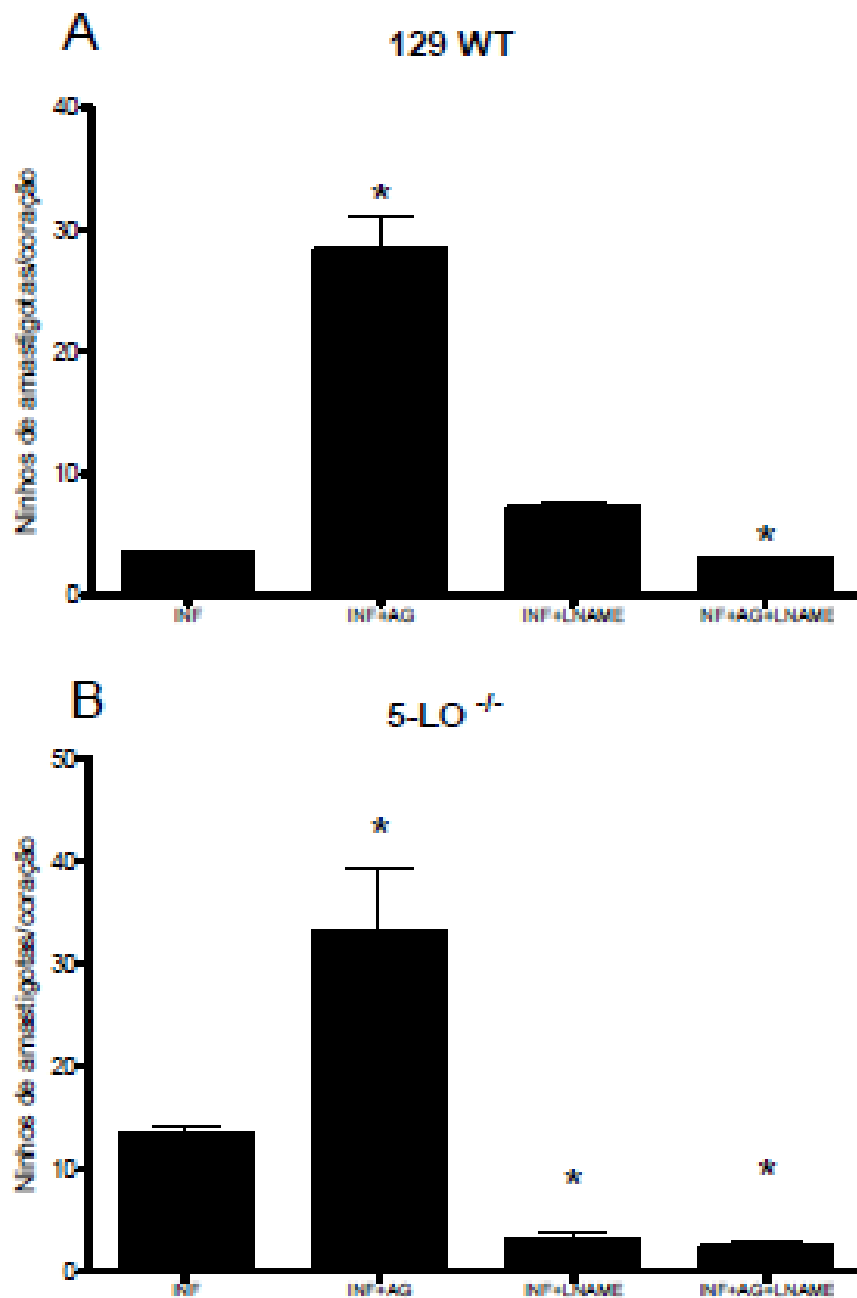


Figura 11 – Quantificação do número de ninhos de amastigotas de *T. cruzi* no tecido cardíaco de camundongos 129 WT e 5-LO^{-/-} no 12^o dia pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas e os tratamentos foram iniciados 4 horas após a infecção, mantidos durante 12 dias. Os tecidos foram fixados em formalina 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e inclusos em parafina. Cortes de 5 μ m foram corados por hematoxilina-eosina e analisados em microscopia de luz, aumento de 400 x. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, representativos de 5 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ indica resultados estatisticamente diferentes. INF=animais infectados, I+AG=animais infectados tratados com aminoguanidina, I+LN=animais infectados tratados com L-NAME, I+AG+LN=animais infectados tratados com aminoguanidina e L-NAME.

4.4 A PRODUÇÃO DE NO DURANTE A INFECÇÃO AGUDA POR *T. CRUZI* É DEPENDENTE DE iNOS E cNOS, OCORRENDO NA AUSÊNCIA DE LEUCOTRIENOS

A produção do NO derivado da iNOS durante a infecção por *T. cruzi* é descrita como fator imprescindível para sobrevivência do hospedeiro; entretanto, a participação da cNOS na produção de NO durante a infecção ainda não foi descrita para este modelo, bem como o papel dos leucotrienos neste processo. Assim, decidimos investigar qual o papel das NOS na produção de NO na presença (camundongos 129 WT) ou ausência (camundongos 5-LO^{-/-}) de leucotrienos, através da utilização dos bloqueadores de cNOS (L-NAME) e iNOS (aminoguanidina), associados ou não, através da dosagem de nitrito plasmático empregando a técnica de dosagem por cádmio padronizada.

Nossos resultados demonstraram que nos animais controles existe uma produção basal de nitrito, independentemente da presença de leucotrienos (Figura 12). A infecção por *T. cruzi* elevou os níveis de nitrito nos animais 129 WT de 8,44 ±1,47 para 59,78±13,69 e nos animais nocautes de 8,24 ±1,39 para 91,04±22,16, indicando que a produção de NO durante a infecção é maior nos camundongos que não produzem leucotrienos.

O tratamento com aminoguanidina foi capaz de reduzir os níveis de nitrito na linhagem 129 WT (de 59,78±13,69 nos animais infectados para 16,96±6,54 nos tratados) e na linhagem 5-LO^{-/-} (de 91,04±22,16 nos infectados para 39,56±12,57 nos tratados). A inibição da cNOS levou à queda significativa na produção de NO apenas nos animais nocautes (de 91,04±22,16 nos infectados para 38,79±16,9 nos tratados). A inibição simultânea da iNOS e cNOS levou à queda significativa apenas nos animais 5-LO^{-/-} (de 91,04±22,16 nos infectados para 35,17±14,63 nos tratados).

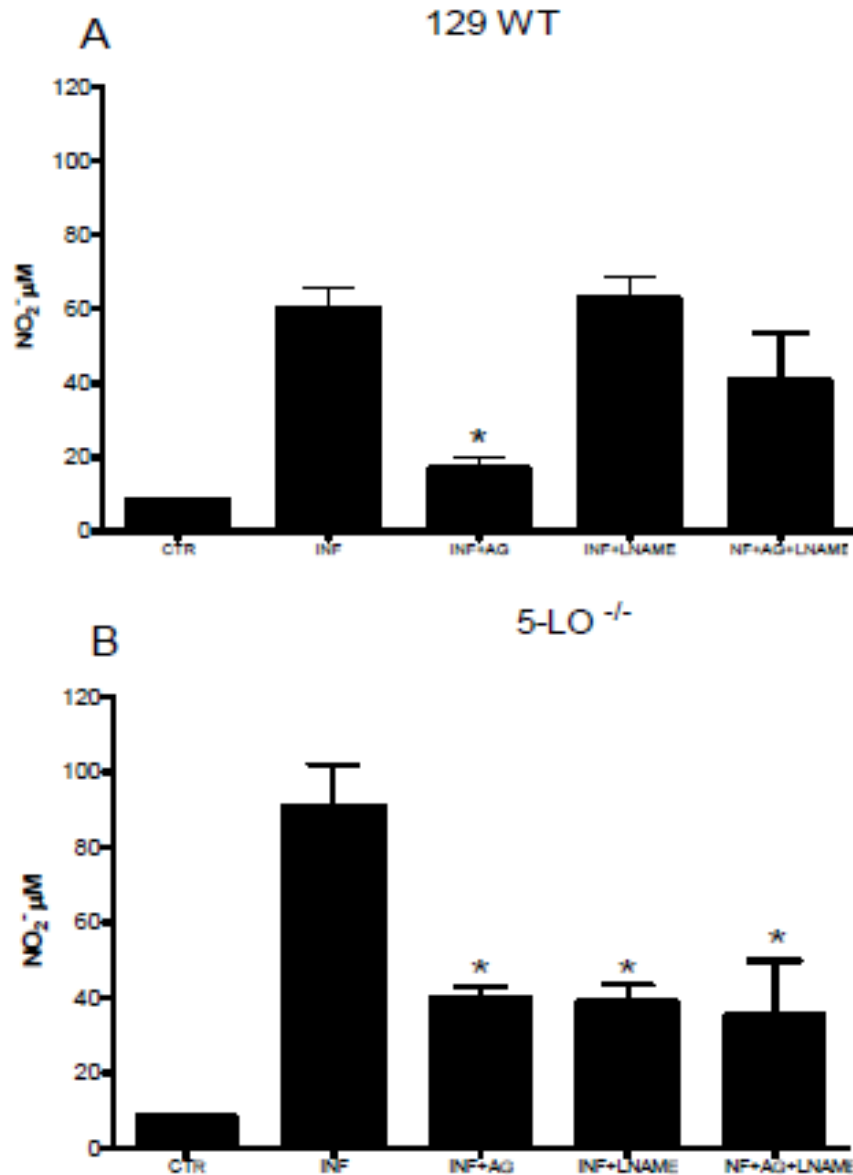


Figura 12 – Produção de nitrito plasmático em camundongos selvagens (129WT) e nocautes para produção de leucotrienos (5-LO^{-/-}) no 12^o dia pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas e os tratamentos foram iniciados 4 horas após a infecção, mantidos durante 12 dias. Os tratamentos administrados nos animais foram injeção de tampão PBS (INF), aminoguanidina 50 mg/kg/dia (AG), L-NAME 20 mg/kg/dia ou aminoguanidina + L-NAME (AG+L-NAME). Os resultados foram expressos como média±desvio padrão, representativos de 3 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ indica resultados estatisticamente diferentes. CTR=animais controle não infectados, INF=animais infectados, I+AG=animais infectados tratados com aminoguanidina, I+LN=animais infectados tratados com L-NAME, I+AG+LN=animais infectados tratados com aminoguanidina e L-NAME.

4.5 PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS

4.5.1 A Produção Basal de Citocinas Plasmáticas é Influenciada pela 5-LO.

A figura 13 mostra o perfil de citocinas nos animais selvagens (129 WT) e nocautes para 5-LO (5-LO^{-/-}). Animais controle nocautes apresentam menores níveis de produção de IL-6 em relação aos animais da linhagem selvagem controle, entretanto, apresentam maior produção de IL-13, IL-17a, IL-23 e TGF- β .

4.5.2 A Infecção com *T. cruzi* Provoca Aumento dos Níveis de IL-6 e IFN- γ Plasmáticos

Observa-se aumento na produção de IL-6 e IFN- γ durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, tanto nos animais selvagens como nos nocautes, embora este aumento tenha sido relativamente maior na ausência de leucotrienos (Figura 13).

4.5.3 O Perfil de Citocinas Produzidas Durante a Infecção é Alterado pelo Bloqueio das NOS.

Como a produção de NO é diretamente influenciada pelo padrão de citocinas produzidas durante a infecção, investigamos o perfil destes mediadores nos animais através do bloqueio farmacológico da iNOS e cNOS.

Na linhagem selvagem, o bloqueio da iNOS levou ao aumento nos níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, INF- γ , TNF- α e TGF- β e redução nos níveis de IL-6, em comparação aos infectados não tratados. Em relação aos animais infectados sem tratamento, os nocautes infectados apresentaram queda na produção de IL-6 após o tratamento com aminoguanidina.

A inibição da cNOS (Figura 14) provocou aumento na produção de IL-10 nos animais selvagens e levou ao aumento significativo nos níveis de INF- γ nos animais nocautes em relação aos animais infectados sem tratamento.

O bloqueio simultâneo de cNOS e iNOS (Figura 15) provocou aumento do IFN- γ , TNF- α e TGF- β nos animais selvagens, enquanto que nos nocautes tratados observou-se queda dos níveis de IL-6 e aumento nos níveis de IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, IL-23, IFN- γ , TNF- α e TGF- β .

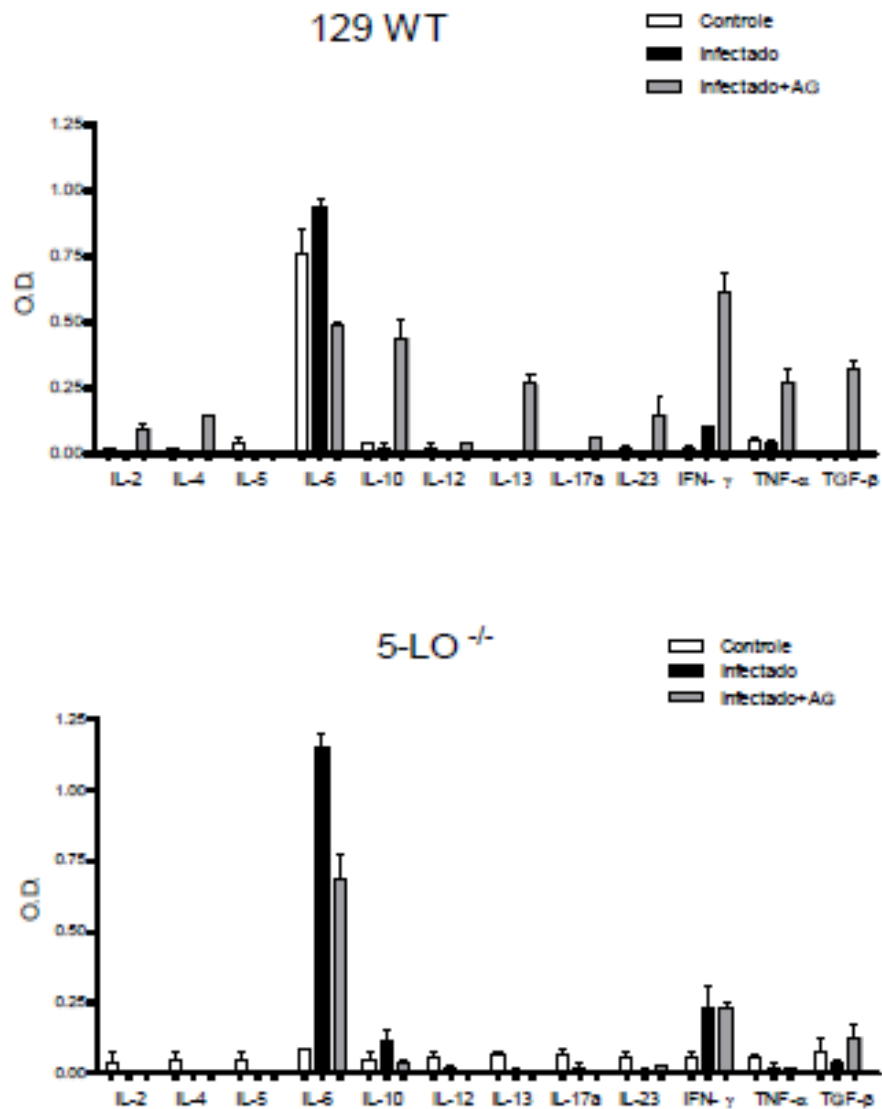


Figura 13- Perfil de citocinas em camundongos selvagens (129WT) e nocautes para produção de leucotrienos (5-LO^{-/-}) no 12^o dia pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas (Infetados e Infetados+AG) e os tratamentos foram iniciados 4 horas após a infecção, mantidos durante 12 dias. Os tratamentos administrados nos animais foram injeção de tampão PBS (Controles e Infetados), aminoguanidina 50 mg/kg/dia(AG). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, representativos de um pool de 12 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ indica resultados estatisticamente diferentes.

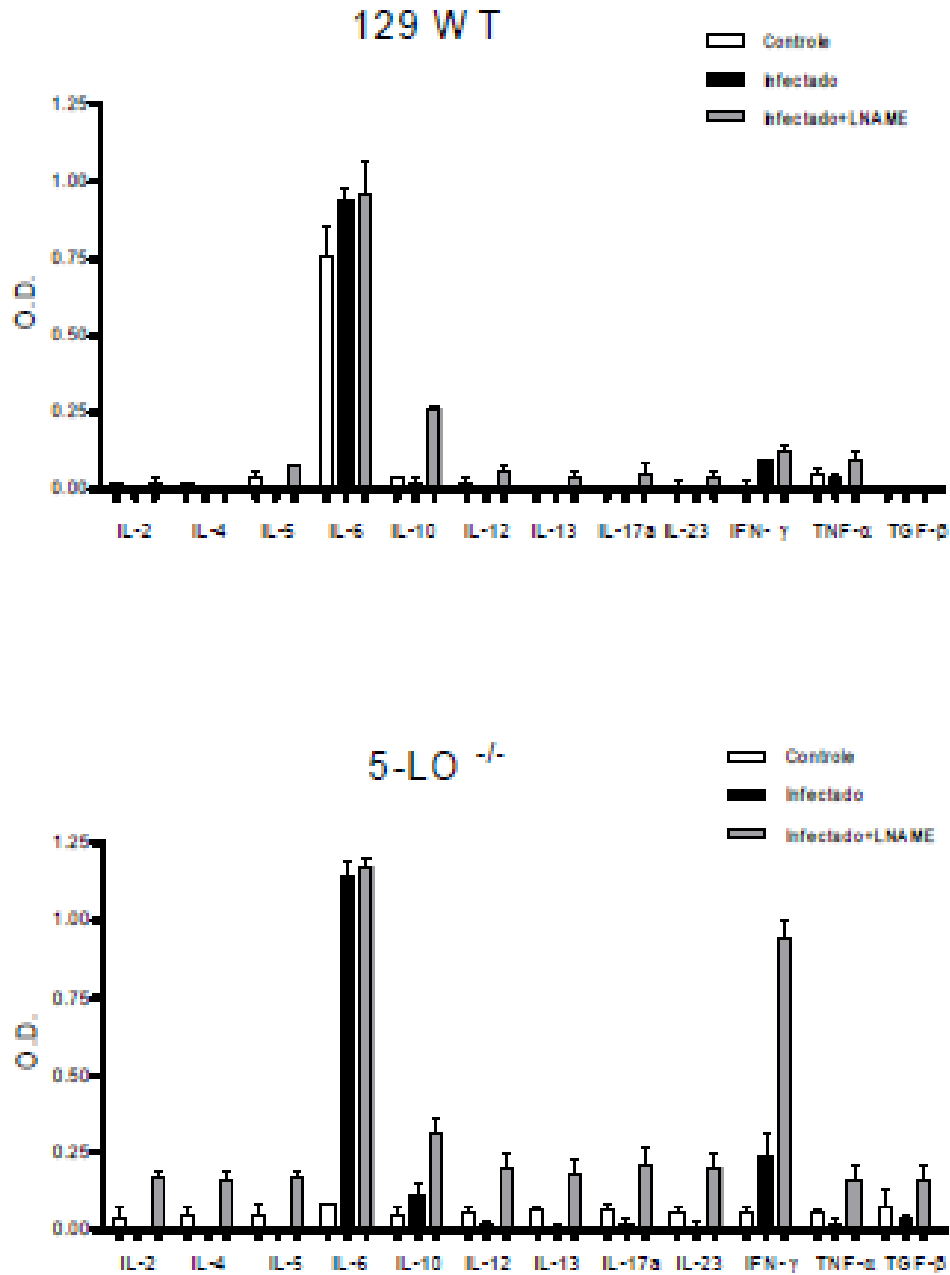


Figura 14 – Perfil de citocinas em camundongos selvagens (129WT) e nocautes para produção de leucotrienos (5-LO^{-/-}) no 12^o dia pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5x10³ formas tripomastigotas (Infectados e Infectados+L-NAME) e os tratamentos foram iniciados 4 horas após a infecção, mantidos durante 12 dias. Os tratamentos administrados nos animais foram injeção de tampão PBS (Controles e Infectados), L-NAME 20mg/kg/dia. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão, representativos de um pool de 12 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * p< 0,05 indica resultados estatisticamente diferentes.

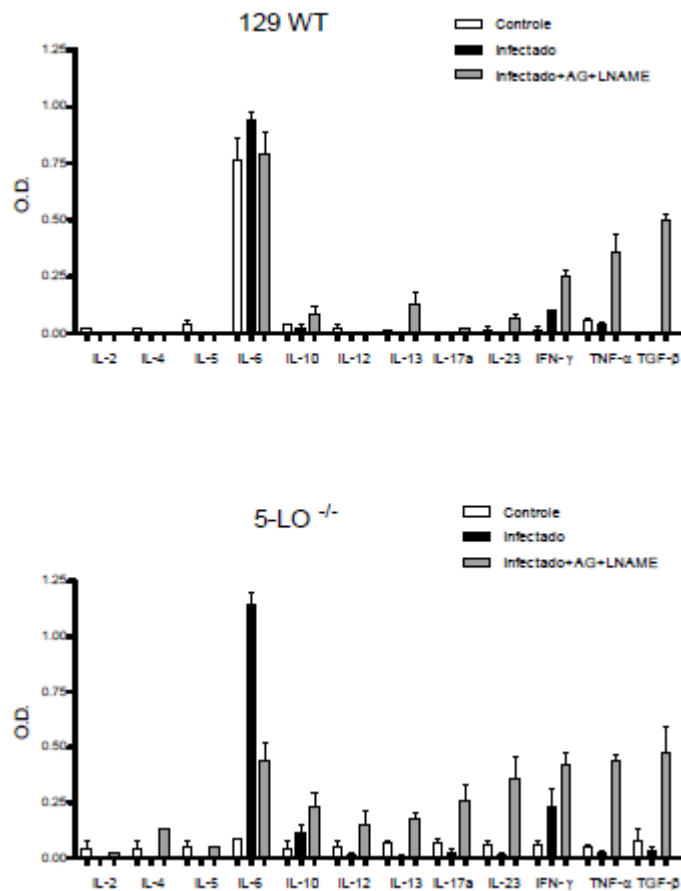


Figura 15 – Perfil de citocinas em camundongos selvagens (129WT) e nocautes para produção de leucotrienos (5-LO^{-/-}) no 12^o dia pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas (Infectados e infectados+AG+L-NAME) e os tratamentos foram iniciados 4 horas após a infecção, mantidos durante 12 dias. Os tratamentos administrados nos animais foram injeção de tampão PBS (Controles e Infectados) ou aminoguanidina 50mg/kg/dia+L-NAME 20mg/kg/dia. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão, representativos de um pool de 12 animais, de 3 experimentos independentes. Os resultados foram comparados por ANOVA seguida de teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ indica resultados estatisticamente diferentes.

5 DISCUSSÃO

Existem diversos métodos para a estimativa dos níveis de NO em amostras biológicas. Ensaio que medem diretamente a concentração de NO são denominados métodos diretos, enquanto que aqueles que estimam a presença do NO a partir de seus metabólitos estáveis são denominados indiretos. Os métodos indiretos, embora não permitam acessar as concentrações de NO especificamente, são os mais empregados na pesquisa devido sua fácil execução, baixo custo, boa sensibilidade e, principalmente, por permitir a detecção dos níveis de metabólitos estáveis do NO, como o nitrito e nitrato (ARCHER, 1993).

A reação de Griess ou ensaio de diazotização (GRIESS, 1879) é considerada a técnica padrão para a mensuração colorimétrica dos níveis de produção de nitrito inorgânico. Esta reação sofreu diversas adaptações ao longo dos anos e tem sido amplamente empregada em diferentes modelos experimentais (ARCHER, 1993). Entretanto, sua capacidade de determinação de nitrito em amostras de plasma e soro é praticamente nula.

Navarro-González e colaboradores (1998) descreveram um método de detecção de nitrito em amostras biológicas humanas utilizando reações de óxi-redução mediadas pelo complexo cádmio-cobre para potencializar sua sensibilidade, convertendo todo o nitrato presente na amostra em nitrito, com posterior detecção pela reação de Griess. Nesta técnica, os autores realizam a incubação da amostra com grânulos de cádmio previamente ativados em solução tampão sulfato de cobre que permitem a obtenção dos níveis séricos basais de nitrito, pela conversão do nitrato presente na amostra.

Neste trabalho, adaptamos este método descrito por Navarro-González e colaboradores (1998) para a determinação simultânea de várias amostras empregando microplacas de 96 poços. O volume de amostra necessário foi de 60 uL, o que representa uma economia de 80% no volume de amostra e de reagentes empregados na técnica utilizada como referência (macrométodo). A execução do teste em microplaca (micrométodo) permitiu a análise simultânea de 40 amostras em duplicata, num período de 2 horas, enquanto que a execução do macrométodo consumiu aproximadamente 5 horas para o mesmo número de amostras, possibilitando a obtenção dos mesmos resultados obtidos pelo micrométodo.

Posteriormente, foi realizada a detecção de nitrito plasmático em amostras de camundongos C57BL/6, tratadas ou não previamente com grânulos de cádmio ativados, com posterior adição do reagente de Griess e leitura a 550 nm. Nossos resultados mostram que quando a amostra sofre tratamento prévio com grânulos de cádmio, seus níveis de nitrito

apresentam-se 6 vezes maiores em relação aos níveis de amostras nas quais adicionou-se apenas o reagente de Griess.

Isso ocorre porque os grânulos de cádmio ativados pelo cobre promovem a redução das moléculas de nitrato, presentes em grande concentração na amostra, em nitrito (GREEN et al., 1992). O micrométodo mostrou-se adequado e sensível para a detecção de nitrito em plasma e soro de camundongos, apresentando características como fácil execução, baixo custo e rapidez na obtenção de resultados. Desta forma, as análises para determinação dos níveis plasmáticos de NO realizadas neste estudo foram determinadas pelo micrométodo descrito neste trabalho.

A infecção aguda por *T. cruzi* caracteriza-se pela produção de uma resposta inflamatória complexa, envolvendo diversos mediadores como NO (BOGDAN, 2001), prostaglandinas (PINGE-FILHO et al., 1999), citocinas (TANOWITZ et al., 1992) e leucotrienos (TALVANI et al.; 2002).

Os LTs são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico por um complexo enzimático intracelular em resposta a agentes infecciosos. Estas substâncias apresentam propriedades biológicas como potencialização da capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, além de potencializar a produção de mediadores com capacidade microbicida por estas células (PETERS-GOLDEN et al., 2005).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório (BORGES, 2007) revelaram que a 5-LO exerce papel fundamental no controle da carga parasitária e no estresse oxidativo durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*. O mesmo perfil de resposta dos animais foi observado neste estudo, onde foi possível detectar um aumento na susceptibilidade dos animais aos parâmetros analisados durante o curso da infecção nos animais deficientes em 5-LO.

Em modelos de infecção utilizando bloqueio genético ou farmacológico da síntese de LTs, observa-se prejuízo da resposta de eliminação do agente (PETERS-GOLDEN et al., 2005). Serezani e colaboradores (2006), em seu estudo sobre o papel dos leucotrienos na infecção por *Leishmania amazonensis* demonstraram, através de um mecanismo dependente da produção de NO, que estes mediadores são fundamentais para a resistência do hospedeiro à infecção parasitária.

A participação do NO produzido pela iNOS no controle da carga parasitária foi investigada previamente em nosso laboratório por Malvezi e colaboradores (2004). Utilizando-se animais C57BL/6 nocautes para iNOS, observou-se aumento significativo da carga parasitária e queda na sobrevivência destes animais, confirmando os resultados obtidos

previamente em outros estudos (SAEFTEL, FLEISCHER, HOERAUF, 2001). O bloqueio da iNOS com aminoguanidina observado promoveu aumento significativo da carga parasitária e redução da sobrevivência em ambas linhagens de camundongos, sendo este efeito mais pronunciado nos animais nocautes para 5-LO, indicando que o controle da carga parasitária mediado pelo NO (via iNOS) é parcialmente dependente de leucotrienos.

Neste estudo demonstra-se pela primeira vez a participação da cNOS sobre a carga parasitária sanguínea e a produção plasmática de NO durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* na ausência de LTs. O bloqueio com L-NAME levou à redução da carga parasitária sanguínea e cardíaca em relação aos animais infectados não tratados nas duas linhagens, sugerindo que a presença da cNOS exerce um efeito modulador positivo sobre o parasita. Estudos conduzidos por diversos pesquisadores têm demonstrado exaustivamente o papel central do NO derivado da iNOS sobre o curso da infecção (VESPA et al., 1994; MALVEZI et al., 2004), sem entretanto, discutir o papel da cNOS neste processo.

Observou-se redução da sobrevivência dos animais nocautes em relação aos selvagens ao longo da infecção; além disso o efeito de todos os bloqueios farmacológicos foi mais intenso na ausência de LTs, indicando que estes mediadores são elementos fundamentais para a sobrevivência dos animais tanto na presença como na ausência das NOS.

Durante a fase aguda da infecção chagásica, as células do tecido cardíaco são infectadas pelo parasita, que forma ninhos de amastigotas por toda a extensão cardíaca (CHANDRASEKAR et al., 1998). Para evidenciar a participação da 5-LO e das NOS sobre o controle do parasitismo cardíaco, foi realizada a análise histopatológica do tecido cardíaco para contagem do número de ninhos de amastigotas teciduais. Os resultados mostram que na ausência de 5-LO o número de ninhos no coração em relação aos animais selvagens quadruplica e que na ausência de iNOS o parasitismo apresenta-se significativamente elevado em ambas linhagens.

Os cardiomiócitos são descritos como tipos celulares que expressam iNOS durante a infecção por *T. cruzi* e que são capazes de limitar a multiplicação e crescimento do parasita (FICHERA et al., 2004), indicando assim que o bloqueio na produção de NO dos animais consiste na perda de um importante mecanismo tripanocida cardíaco. A presença da cNOS no tecido cardíaco foi descrita por Chandrasekar e colaboradores (2000), que detectaram sua expressão a partir da 36^a hora em ratos infectados por *T. cruzi*. Nossos dados indicam que existe participação da cNOS durante toda a fase aguda da infecção nos animais nocautes, onde ocorreu queda do parasitismo cardíaco em níveis inferiores aos dos animais infectados sem tratamento, sugerindo a ativação deste mecanismo na ausência da 5-LO.

Os dados obtidos neste trabalho sobre o parasitismo cardíaco dos animais sugerem que existe uma participação da iNOS no controle do parasitismo cardíaco independentemente de leucotrienos (embora na ausência destes mediadores isoladamente tenha-se observado aumento do parasitismo) e que na ausência da 5-LO a cNOS favorece a multiplicação intracelular do parasita.

Diversos estudos demonstram que a produção de NO em diferentes células é mediada por leucotrienos, podendo ser concentração-dependente (SEREZANI et al.; 2006; TALVANI et al.; 2002; LARFARS et al.; 1999; GOLDMAN et al.; 1993). Neste trabalho demonstramos que a produção basal de NO nos animais deficientes em 5-LO é semelhante aos níveis observados nos animais selvagens. Durante a infecção, houve grande produção de NO pelos animais nocautes, em quantidade significativamente superior aos níveis dos animais selvagens, indicando que a presença de leucotrienos neste modelo de infecção não é essencial para que haja produção de NO.

Os efeitos fisiológicos do NO são determinados pela atividade da cNOS, já que o NO é produzido por um curto período de tempo e em baixas concentrações. Em contrapartida, a iNOS é responsável pelos efeitos patológicos do NO, já que neste caso ocorre a produção sustentada deste mediador em altas concentrações (CECCHINI et al.; 2008).

Nós observamos que a iNOS parece ser uma importante fonte de produção de NO durante a infecção, já que seu bloqueio provocou queda nos níveis de NO plasmático em ambas linhagens. O bloqueio da cNOS levou à redução da produção de NO apenas na ausência de 5-LO, indicando que a cNOS é uma importante fonte de NO na ausência de leucotrienos. Em ambos os casos, pode-se afirmar que a produção de NO em altos níveis promove seu efeito tripanocida e, ao mesmo tempo, respondeu por alterações deletérias no animal, observadas pela má evolução do estado geral dos animais infectados (dados não mostrados).

Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez que o perfil de citocinas é influenciado pela 5-LO, tanto nas condições basais como durante a infecção por *T. cruzi*. Adicionalmente, demonstramos que as NOS promovem alterações importantes nos níveis de citocinas produzidas no curso da fase aguda da infecção. É descrita a existência de um mecanismo altamente complexo que atua sobre a inter regulação entre a produção de citocinas, atividade das NOS e produção de NO, envolvendo diferentes vias sinalizadoras que regulam de positiva ou negativamente este processo (BOGDAN, 2001).

Pinge-Filho e colaboradores (1999) demonstraram que durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorre supressão das respostas linfoproliferativas, que pode ser explicada por uma diminuição na produção de IL-2 e produção de prostaglandinas.

Interessantemente, nossos dados mostram que a infecção, de fato, promoveu queda nos níveis de IL-2, como demonstrado anteriormente, mas essa diminuição ocorreu de maneira independentemente da presença ou da ausência de LTs, sugerindo que metabólitos decorrentes da ativação da 5-LO, ao contrário dos metabólitos oriundos da ativação da via da cicloxigenase, parecem não atuar de maneira importante na modulação negativa da IL-2 durante a imunossupressão que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi*.

Animais controle nocautes apresentaram menores níveis basais de IL-6 em relação aos animais selvagens controle, o que pode estar relacionado à sua deficiência na produção de leucotrienos e, conseqüentemente, baixa capacidade em gerar uma resposta inflamatória satisfatória pelos linfócitos T (PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007). Apesar da baixa produção de IL-6, estes animais apresentam níveis plasmáticos elevados de IL-13, IL-17a, IL-23 e TGF-P em relação aos animais selvagens, podendo este aumento estar associado a uma resposta compensatória fisiológica à ausência de leucotrienos.

A infecção por *T. cruzi* desencadeia a produção de uma série de mediadores, como as citocinas e o NO, que atuam sobre as células estimulando os mecanismos imunológicos efetores (CUMMINGS; TARLETON, 2004). Nossos dados demonstram que as duas linhagens de camundongos analisadas são capazes de responder à presença do parasita através da produção de citocinas, embora sejam observados perfis distintos.

Observou-se aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IFN- γ durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, tanto nos animais selvagens como nos nocautes.

Os altos níveis de IL-6 observados podem estar associados ao papel desta citocina sobre a resposta inflamatória aguda à infecção, através da ativação e diferenciação de linfócitos T, estímulo da produção hepática de proteínas de fase aguda e produção de anticorpos pelos linfócitos B (FEGHALI; WRIGHT, 1997). Embora a deficiência de 5-LO seja um provável fator limitante para a geração da resposta inflamatória nos animais nocautes, foi observada a produção de citocinas pró-inflamatórias (e de NO) durante a infecção, indicando que estes mecanismos sejam independentes.

O bloqueio da iNOS levou ao aumento nos níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α e TGF-P e redução nos níveis de IL-6, na linhagem selvagem em comparação aos infectados não tratados, enquanto os nocautes apresentaram apenas queda na

produção de IL-6. O perfil de citocinas observado nos animais selvagens durante o bloqueio da iNOS sugere uma mudança do padrão de resposta celular, com produção significativa de citocinas do padrão Th2. IFN- γ e TNF- α são mediadores essenciais para que haja produção de NO e combate ao parasita (CUMMINGS; TARLETON, 2004), portanto, seus níveis elevados podem estar refletindo uma produção aumentada destas citocinas para estimular os macrófagos de forma a elevar os baixos níveis de NO observados durante o bloqueio da iNOS.

A inibição da cNOS durante a infecção promoveu aumento na produção de IL-10 nos animais selvagens e aumento nos níveis de IFN- γ nos nocautes. Observa-se a mudança do perfil de citocinas nestes animais, sendo que na ausência de cNOS a linhagem selvagem sofre alteração do padrão de citocinas Th1 para Th2. Esta mudança no padrão de citocinas não alterou os padrões avaliados durante o curso da infecção nos animais selvagens (parasitismo cardíaco, sobrevivência, parasitemia, produção de NO), indicando que a cNOS não participa dos mecanismos regulatórios de defesa destes animais em resposta ao *T. cruzi*.

A participação da cNOS no curso da infecção aguda pelo *T. cruzi* mostrou-se bastante pronunciada nos animais nocautes para 5-LO. O bloqueio da cNOS induziu aumento dos níveis plasmáticos de IFN- γ , indicando que na sua presença há inibição dos mecanismos microbicidas contra o parasita. O IFN- γ é descrito como principal indutor da produção de NO (MARTIN, NATHAN, XIE, 1994); entretanto, este aumento de IFN- γ não foi suficiente para manter ou elevar os níveis de NO produzidos pela iNOS em resposta à infecção durante o bloqueio da cNOS.

O bloqueio da produção de NO pela cNOS e iNOS simultaneamente provocou aumento dos níveis de IFN- γ , TNF- α e TGF- β nas duas linhagens, demonstrando que estas enzimas participam dos processos que regulam os padrões de citocinas produzidos em resposta ao *T. cruzi*. Nos nocautes, o bloqueio das NOS promoveu queda dos níveis de IL-6 e aumento nos níveis de IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a e IL-23, direcionando a resposta imunológica para a produção de citocinas do padrão Th2 na ausência de leucotrienos.

Em resumo, observa-se que as isoformas da NOS estudadas apresentam efeitos antagônicos em resposta à infecção aguda por *T. cruzi*. A cNOS parece atuar por meio de mecanismos que favorecem a sobrevivência do parasita, enquanto a iNOS modula a infecção potencializando os mecanismos tripanocidas do hospedeiro. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos moleculares que regulam este sistema e permitir melhor entendimento do seu papel no curso da infecção chagásica.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A 5-LO participa do controle da carga parasitária durante a infecção por *T. cruzi*;
- Observa-se efeitos antagônicos do bloqueio da iNOS e cNOS sobre a carga parasitária, parasitismo cardíaco e sobrevivência de camundongos 5-LO^{-/-};
- Os resultados observados nos animais nocautes tratados com L-NAME sugerem que a cNOS apresenta um efeito modulador positivo sobre o parasita ao longo da infecção;
- A produção de NO durante a infecção aguda por *T. cruzi* é dependente de iNOS e cNOS, ocorrendo na ausência de leucotrienos;
- A produção basal de citocinas plasmáticas é influenciada pela 5-LO;
- A infecção com *T. cruzi* provoca aumento dos níveis de IL-6 e INF- γ e queda nos níveis de IL-2 plasmáticos, sendo que o perfil de citocinas produzidas durante a infecção é modulado pelas NOS.
- Observa-se a mudança do perfil de citocinas nos animais nocautes, sendo que na ausência de cNOS, a linhagem selvagem altera o padrão de citocinas de Th1 para Th2.

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice and is produced by murine macrophages in response to live tripomastigotes. **Infect. Immun.**, 64(6): 1961-1967, 1995.
- ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; GAZINELLI, 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 (6): 2810-2814, 1999.
- AMATO-NETO, V. Tratamento específico da Doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.**, 70 (1): 63-64, 1998.
- ANDRADE, S. G. **Patologia experimental da doença de Chagas: modelos em camundongos**. Disponível em:
<<http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.fiocruz.br/chagas/media/Carlos%2520Chagas%2520e%2520pacientes%2520no%2520Hospital%2520do%2520Instituto%2520Oswaldo%2520Cruz%252001.jpg&imgrefurl=http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm%3Fsid%3D33&h=501&w=350&sz=151&hl=ptR&start=2&um=1&usq=Jd6fHoVQFsKbSf1wwlF48s5eRIU=&tbnid=mWYQQK5gzwbpQM:&tbnh=130&tbnw=91&prev=/images%3Fq%3Dcarlos%2Bchagas%2B1909%2B1922%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR>>. Acesso em: 4 nov. 2008.
- ANDRADE, Z. A. Patologia da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 12, p. 200-230.
- 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.
- APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; MITCHELL, J. A.; WILLOUGHBY, D. A. Distribution of cyclooxygenase isoforms in murine chronic granulomatous inflammation. Implications for future anti-inflammatory therapy. **J. Pathol.** 176: 413-420, 1995.
- AUSTEN, K. F. The cysteinyl leukotrienes: Where do they come from? What are they? Where are they going? **Nature**, 9(2): 113-115, 208.
- BARBOSA-DE-OLIVEIRA, L. C.; CUROTTO-DE-LAFAILLE, M. A.; LIMA, G. M. C.; ABRAHAMSOHN, I. A. Antigen-specific IL-4 and IL-10 secreting CD4+ lymphocytes increase *in vivo* susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell. Immunol.**, 170: 41-53, 1996.
- BASSO, B. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. **Vaccine**, 7; 22(15-16):1868-72, 2004.
- BEÇAK, W.; PAULETE-VANRELL, J. **Técnicas de citologia e histologia**. São Paulo: Nobel, 1970.

- BLITZMAN, M. **Enfermedad de Chagas-Mazza**. Disponível em: <<http://www.fac.org.ar>>. Acesso em: 4 de março 2007.
- BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 20:1707-1715, 2000.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and immune response. **Nature**, 2(10): 907-916, 2001.
- BORGES, C. L. **Papel da 5-lipoxigenase no controle da carga parasitária no estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi***. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica: Doença de Chagas aguda por transmissão oral (2005)**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2609.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Brasil receberá certificado internacional da interrupção da transmissão vetorial da Doença de Chagas pelo *Triatoma Infestans* (2006)**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/notatecnica_chagas0806.pdf>. Acesso em: 20 junho 2008.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 4: 398396, 1962.
- BRENNER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Rev. Microbiol.**, 27:347382, 1973.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Ann. Rev. Microbiol.** 49:175.-200, 1995.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with benzonidazole. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 44:29-37, 2002.
- CARDILLO F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.**, 64:128-34, 1996.
- CARDILLO, F.; CUNHA, F. Q.; TAMASHIRO, W. M.; RUSSO, M.; GARCIA, S. B.; MENGEL, J. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.**; 55:96-104, 2002.
- CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experiental. *Trypanosoma cruzi* infection. **Méd. Inflamm.**, 13(4), 235-240, 2004.
- CARDONI, R. L.; ANTÚNEZ, M. I.; MORALES, C.; NANTES, I. R. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 56: 329-334, 1997.

- CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 75: 97-104, 1980.
- CECCHINI, A. L.; IAMAMOTO, C. A.; PINGE-FILHO, P.; FERNANDES, P. B.; CECCHINI, R. A bioquímica do óxido nítrico. In: WATANABE, M. A.; ONO, M. A.; CECCHINI, R.; ITANO, E. N. **Tópicos em patologia experimental**. Londrina: EDUEL, 2008. p. 95-114,
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Division of parasitic diseases**: Chagas disease fact sheet. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsht_chagas_disease.htm>, Acesso em: 4 mar. 2007.
- CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanozomíase americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 15: 67-76, 1922.
- 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.
- CHAGAS, C.; VILELLA, E. Forma cardíaca da trypanosomíase americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 14: 5-61, 1922.
- CARDONI, R. L.; ANTÚNEZ, M. I. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Med. Inflamm.**, 13(4), 235-240, 2004.
- CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; COLSTON, J. T.; FREEMAN, G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagas'cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.**, 152 (4): 925-934, 1998.
- CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; FREEMAN, G. L. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Clin. Exp. Immunol.**, 121:112-119, 2000.
- CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbid-mortality in Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I): 309-310, 1999.
- COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; MENEGAZZI, M. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression: suppression by exogenous nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 270:26731-26733, 1995.
- COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends Pharmacol. Sci.**, 21:249-252, 2000.
- COSTA, S. C. G. Mouse as a model for Chagas Disease: Does mouse represent a good model for Chagas Disease? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I):269-272, 1999.
- COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I INFs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, 177(5):3193-3200, 2006.

COWBURN, A. S.; HOLGATE, S. T.; SAMPSON, A. P. IL-5 increases expression of 5-lipoxygenase-activating protein and translocates 5-lipoxygenase to the nucleus in human blood eosinophils. **J. Immunol.**, 163: 456-495, 1999.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, 72(7): 4081-4089, 2004.

DE SOUZA, W. Cell biology of *T. cruzi*. **Int. Rev. Cytol.**, 86:197-283, 1984.

DENICOLA, A.; SOUZA, J. M.; RADU, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 3566-3571, 1998.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be Called *cruzi* Complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98(1): 1-12, 2003.

DIAS, J. C. P. **O tratamento específico da Doença de Chagas**. Conferência Nacional de Saúde on-line. Belo Horizonte, abril de 1999. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/cns>>. Acesso em: 21 fev. 2007.

DIAS, J. C. P.; SHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I): 103-121, 1999.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas Disease control in Latin America - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97, (5): 603-612, 2002.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 28(2):81-87, 2006.

DVORAK, J. A. New in vitro approach to quantization of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. **New Appr. Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub.** 318:109-20, 1975.

FARREL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Ann. Reum. Dis.**, 55: 7-20, 1996.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front. Biosc.**, 2: d12-26, 1997.

FERNANDES, O.; SANTOS, S. S.; JUNQUEIRA, A. C. V.; JANSEN, A. M.; CUPOLLILO, E.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B.; COURA, J. R. Populational heterogeneity of brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini exon and ribosomal spacers. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I): 195-197, 1999.

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

FICHERA, L. E.; ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A.; POSTAN, M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. **Infect. Immun.**, 72(1): 359-363, 2004.

FORATTINI, O. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev. Saúde Públ.** São Paulo, 14: 265-299, 1980.

FUJIMOTO, Y.; TAGANO, S.; OGAWA, K.; SAKUMA, S.; FUJITA, T. Comparison of the effects of nitric oxide and peroxy-nitrite on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. **Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids**, 59:95-100, 1998.

FUJIMURA, A. E. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immun. induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect Immun.**, 69(9):5477-86, 2001.

FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288:373-6, 1980.

GARCIA, E. S.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(1): 213-216, 1999 .

GARDINER, S. M.; CAMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNETT, B. S. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG - nitro-L- arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. **Brit. J. Pharmacol.**, 101: 625-663, 1990.

GARG, N.; TARLETON, R. L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immunity**, 70: 5547-5555, 2002.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95: 557-565, 2000.

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

GHAZALPOUR, A.; WANG.; LUSIS, A. J.; MEHRABIAN, M. Complex inheritance of the 5-lipoxygenase locus influencing atherosclerosis in mice. **Genetics**, 173: 943-951, 2006.

GIDDINGS, O.K.; EICKHOFF, C. S.; SMITH, T. J.; BRYANT, L. A.; HOFT, D. F. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. **Infect. Immun.**, 74 (10): 5549-5560, 2006.

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

GOLDBLATT, W. Properties of human seminal fluid. **J. Physiol.**, 84:208-218, 1935.

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

GORELIK, G. T lymphocytes from *T. cruzi*-infected mice alter heart contractility: participation of arachidonic acid metabolites. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 24 (1):9-20, 1992.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>>. Acesso em: 12 abr. 2007.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**; 26:131- 138, 1982.

GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "ueber einige azoverbindugen". **Chem. Ber.**, 12: 426-428, 1879.

HARRIS, T. H.; COONEY, M. N.; MANSFIELD, J. N.; PAULNOCK, D. Signal transduction, gene transcription and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. **Infect. Immun.**, 74(8): 4530-4537, 2006.

HAUSCHKA, T. S. Sex of host as a factor in Chagas' disease. **J. Parasitol.**, 33: 399-405, 1974.

HSIEH, F. H.; LAM, B. K.; PENROSE, J. F.; AUSTEN, K. F.; BOYCE, J. A. T. helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C4 synthase expression by interleukin-4. **J. Exp. Med.**; 193: 123-133, 2001.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **Plos Negl. Trop. Dis.**, 9(2): e300, 2008.

HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAÚJO, F. Interleukin-12 mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor α and gamma interferon. **Infect. Immun.**, 64(7): 2381-2386, 1996.

HYBISKE, K.; STEPHENS, R. S. Exit strategies of intracellular pathogens. **Nature Rev. Microbiol.**, 6: 99-110, 2008.

KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R. A.; CODER, D.; ARUFFO, A.; FARR, A. The major surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infect. Immun.**, 64 (7): 2649-2656, 1996.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. **Lipids**, 27: 46-49, 1992.

KANNO, S.; LEE, P. C.; ZHANG, Y. Attenuation of myocardial ischemia/ reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. **Circulation**, 101:2742-2748, 2000.

KELLY, R. A.; BALLIGAND, J. L.; SMITH, T. Nitric oxide and cardiac function. **Circ. Res**, 79:363-380, 1996.

- KIERSZENBAUM, F.; DE DIEGO, J. L.; FRESNO, M.; SZTEIN, M. B. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL2 receptor chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, 29:1684, 1999.
- KOGA, R.; HAMANO, S. J.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of INF- mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 177: 7059-7066, 2006.
- KROPF, S. P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). **Tempo**, 19: 107-124, 2005.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. M. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:4651-4655, 1991.
- KURZROK, R., LIEB, C. C. Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 28:268-272, 1930.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap 11, p. 85-108.
- LARFARS, G.; LANTOINE, F.; DEVYNH, M. A.; PALMBLAD, J.; GYLLEMMHAMMAR, H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B4, C4 and D4 in human polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, 93:1399, 1999.
- LEVY, B. D. C. B.; CLISH, B.; SCHMIDT, K.; GRONERT, 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 de 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease. **N. Engl. J. Med.**, 323: 645, 1990.
- LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S. E. B.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clin. Exp. Immunol.**, 145:357-364, 2006.
- LINDE, A.; MOSIERB, D.; BLECHAA, F.; TONATIUH, M. Innate immunity and inflammation - New frontiers in comparative cardiovascular pathology. **Cardiovascular Res.**,73 (1): 26-36, 2006.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-75, 1951.
- MACEDO, V. Indeterminate form of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I): 311-316, 1999.
- 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 controlo f parasite burden in murine strongyloidiasis. **J. Immunol.**, 175: 3892-3899, 2005.

- MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, 5, 323-350, 1997.
- MAGUIRRE, J. Chagas's Disease: Can we stop the deaths? **N. Engl. J. Med.**, 355: 760, 2006.
- MAGUIRRE, J. H.; HOFF, R. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas'disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, 75 (6): 1140-1145, 1987.
- MALVEZI, A. D.; CECCHINI, R.; SOUZA, F.; TADOKORO, C. E.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-a in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Imm. Med. Microb.**, 41: 69-77, 2004.
- MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BRYNIARSKI, K.; CHAIN, B. M. Enhancement of CD4+ T-cell dependent interleukin-2 production *in vitro* by murine alveolar macrophages: the role of leukotriene B4. **Immunol.**, 91: 369374, 1997.
- MARINHO, C. R. F.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; GRISOTTO, M. G.; ALVAREZ, J. M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, 308-318, 1999.
- MARTINS, G. A. Gamma interferon modulates CD95 Fas and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infect. Immun.** 67, 3864-3871, 1999.
- MARTIN, E.; NATHAN, C.; XIE, Q. W. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, 180:977-984, 1994.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, 22:477- 481, 1997.
- MEHANNA, A.; VITORINO, D. C.; PANIS, C.; BLANCO, E. E. A.; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. **Life Sci.**, 81(16):1301-1308, 2007.
- MEIRELLES, M. N. L.; PEREIRA, M. C. S.; SINGER, R. H.; SOEIRO, M. N. C.; GARZONI, L. R.; SILVA, D. T.; BARBOSA, H. S.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; MASUDA, M. O.; CAPELLA, M. A. M.; LOPES, A. G.; VERMELHO, A. B. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: New contributions regarding a better understanding of this interaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I): 149-152, 1999.
- MELDRUM, D. R. Tumor necrosis factor in the heart. **Am. J. Physiol.**, 274:577-595, 1998.
- MELO, R. C.; BRENNER, Z. Tissue tropism of different *T. cruzi* strains. **J. Parasitol.** 64:475-482, 1978.
- MELO, R. C.; MACHADO. C. R. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection en rats. **Exp. Parasitol.**; 97(1):15-23, 2001.

- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature Rev.**, 442(6): 39-44, 2006.
- MICHAJLOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES- VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Pathol.** 159:1723-1733, 2001.
- MICHELIN, M. A. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.**, 111(2):71-79, 2005.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSERC, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TcRI T cells. **Immunol. Rev.**, 112:183, 1989.
- MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I): 181-184, 1999.
- MONCADA, S., HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.**, 21:361-374, 1991.
- MORI, M.; GOTOH, T. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. **J. Nutr.**, 134:2820S-2825S, 2004.
- NAVARRO-GONZÁLVIZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin. Chem.**, 44(3):670-681, 1998.
- NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADI, R. Protein 3- nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Bras. J. Med. Biol. Res.**; 38: 1825-1834, 2005.
- NEWTON, B. A. Biochemical peculiarities of trypanosomatid flagellates. **Annu. Rev. Microbiol.**, 22:109-130, 1968.
- NOVERR, M. C.; ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. **Clin. Microbiol. Rev.**, 16(3): p. 517-533, 2003.
- OUAISSI, A.; SILVA, A. C.; GUEVARA, A. G.; BORGES, M.; GUILVARD, E. *Trypanosoma cruzi*-induced host immune system dysfunction: a rationale for parasiteimmunosuppressive factor(s) encoding gene targeting. **J. Biom. Biotechnol.**, 1:11-17, 2001.
- PADILLA, A.; XU, D.; MARTIN, D.; TARLETON, R. Limited role for CD₄⁺ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8⁺ T-cells. **Infect. Immun.**, 75(1): 231-235, 2007.
- PAKIANATHAN, D. R.; KUHN, R. E. Interleukin-2 receptors in experimental Chagas'Disease. **Infect. Immun.** 60 (9): 3904-3908, 1992.
- PALOMBA, L.; PERSICHINI, T.; MAZZONE, V.; COLASANTI, M.; CANTONI, A. Inhibition of nitric oxide synthase I (NOS-I) dependent nitric oxide production by

lipopolysaccharide plus interferon is mediated by arachidonic acid. **J. Biol. Chem.**, 79 (29): 29895-29901, 2004.

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin 1-p in *Trypanosoma cruzi* induced cardiomyocytes hypertrophy. **Infect. Immun.**, 71(8): 4441-4447, 2003.

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M. J. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune response. **J. Immunol.**, 174: 589-594, 2005.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W. R. Leukotrienes. **N. Engl. J. Med.**, 357(18): 1841-1854, 2007.

PETRAY, P. M. E.; ROTTENBERG, S. G.; ORN, A. Release of nitric oxide for the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Immunol.**, 16:193-199, 2004.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell. Immunol.**, 193(1):90-8, 1999.

PINTO, P. L. S. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, São Paulo, v.54, p.141-146, 1999.

QIU, H.; JOHANSSON, A. S.; SJOSTROM, M.; WAN, M.; SCHRODER, O.; PALMBLAD, J.; HAEGGSTROM, J. Z. Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines and leukotriene B4. **PNAS**, 103(18): 6913-6918, 2006.

RASSI, A. et al. Fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 13, p. 231-245.

REIS, G. A.; LOPES, M. F. A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 9, p. 153-169.

RISSO, M. G.; GARBARINO, G. B.; MOCETTI, E.; CAMPETELLA, O.; GONZALEZ-CAPPA, S. M.; BUSCAGLIA, C. A.; LEGUIZAMON, M. S. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 2250-2259, 2004.

RODRIGUES, L. E. A. Prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e lipoxinas: aspectos bioquímicos e médicos. São Paulo: Atheneu, 1992.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin. Exp. Immunol.**; 128:421-428, 2002.

ROWLAND, E. Infection characteristics of an Ecuadorian *Trypanosoma cruzi* strain with reduced virulence. **J. Parasitol.**, 81(1):123-126, 1995.

- SABROE, I.; PARKER, L. C.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K. B. The role of TLR activation in inflammation. **J. Pathol.**, 214: 126-135, 2008.
- SAEFTEL, M., FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** 69:2252-2259, 2001.
- SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M. E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Ann. Rev. Microbiol.**, 48:499-495, 1994.
- SCHMUNIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 1, p. 1-15.
- SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone programme against Chagas Disease. **Adv. Parasitol.**, 42:1-25, 1999.
- SCHÖNECK, R.; MARTY, B.; TAIBI, A. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. **Biol. Cell.**, 80:1, 1994.
- SEREZANI, C. H.; PERRELA, J. H.; RUSSO, M.; PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation and susceptibility. **J. Immunol.**, 177:3201-3208, 2006.
- SERIO, K. J.; JOHNS, S. C.; LUO, L.; HODULIK, C. R.; BIGBY, T. D. Lipopolysaccharide down-regulates the leukotriene C4 synthase gene in the monocyte-like cell line, THP-1. **J. Immunol.**; 170: 2121-2128, 2003.
- SILVA, A. P. G.; ABRAHAMSON, I. A. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol.**, 104:349-354, 2001.
- SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PÁDUA, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31(1): 111-115, 1998.
- SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clin. Biol.** 20: 191208, 1953.
- 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.
- SZCZEPAN, J.; BIEDRON, R.; BOBEK, M.; MARCINKIEWICZ, J. Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells. **Immunol.**, 116: 418-428, 2005.
- SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (I):257-262, 1999.

- SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 7, p. 89-126.
- 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 *Trypanosoma cruzi*-Infected Murine Macrophages and Mediates Resistance to Infection. **Infect. Immun.**, 70 (8): 4247-4253, 2002.
- TANOWITZ, H. B.; GUMPRECHT, J. P.; SPURR, D.; CALDERON, T. M.; VENKURA, M. C.; RAVENTOS-SUAREZ, C.; KELLIE, S.; FACTOR, S. M.; HATCHER, V. B.; WITTNER, M.; BERMAN, J. W. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, 166:598-603, 1992.
- TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today**, 11:7-9, 1995.
- TARLETON, R. L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 73: 186-190, 1988.
- TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L.; PONSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect. Immun.** 62:1820-1829, 1994.
- TATAKIHARA, V. L. H.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI A. D.; GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, 52(1) 47-58, 2008.
- TAYLOR, A.; VERHAGEN, J.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells. **Immunol.**, 117, 433-442, 2006.
- TEIXEIRA, A. R. L.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, J. M.; ARGANARAZ, E. R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C. A.; SILVA, A. R.; AULT, S. K.; COSTA, J. M. Emerging Chagas Disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon. **Em. Infect. Dis.**, 7 (1): 100-112, 2001.
- TOLEDO, M. J. O.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TAFURI, W. L.; DE LANA, M. Chemotherapy with benzonidazole and itraconazole or mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimic. Ag. Chem.**, 47: 223230, 2003.
- TOLEDO, M. J. O.; KÜHL, J. B.; SILVA, S. V.; GASPERI, M. V.; ARAÚJO, S. M. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, sul do Brasil. Resultados preliminares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30(3): 197-203, 1997.
- TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; DAMME, J. D.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. **Infect. Immun.**, 62(2): 692-696, 1994.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, 8:253-278, 1990.

VAN VOORHIS, W. C. Co-culture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. **J. Immunol.** 148:239-248, 1992.

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

VON EULER, U. S. On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man certain animals (prostaglandin and vesiglandin). **J. Physiol.**, 88:213-234, 1936.

WANDERLEY, D. M. V. et al. Doença de Chagas como causa básica de óbito na região sudeste do Brasil: presença de causas contributórias. **Rev. Saúde Pub.**, 28: 69-75, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease**. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>>, Acesso em 3 jan. 2007.

_____. **Report of the scientific working group on Chagas Disease**. Buenos Aires: 17-20. apr. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2007.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with an intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 134:1989-1993, 1985.

XIE, Q.; WHISNANT, W. R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon and bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, 177: 1779-1784, 1993.

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

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol. Int.**, 57: 105-109, 2008.