



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Efeito do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre a carga parasitária, produção de óxido nítrico e estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Vera Lúcia Hideko Tatakihara

LONDRINA-PARANÁ

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO BLOQUEIO DE COX-1 E DE COX-2 SOBRE A CARGA
PARASITÁRIA, PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE
OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS DURANTE A FASE AGUDA DA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi***

Vera Lúcia Hideko Tatakihara

Londrina

2007

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T216e Tatakihara, Vera Lúcia Hideko.
Efeito do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre a carga parasitária, produção de óxido nítrico e estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* / Vera Lúcia Hideko Tatakihara. – Londrina, 2007.
98f. : il.

Orientador : Phileno Pinge Filho.
Co-orientador : Rubens Cecchini.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2007.
Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Agentes anti-inflamatórios não-esteróides – Teses. 4. Ciclooxygenase – Teses. 5. Óxido nítrico – Teses. I. Pinge Filho, Phileno. II. Cecchini, Rubens. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616.937.3

VERA LÚCIA HIDEKO TATAKIHARA

**EFEITO DO BLOQUEIO DE COX-1 E DE COX-2 SOBRE A CARGA
PARASITÁRIA, PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE
OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS DURANTE A FASE AGUDA DA
INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi***

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

**Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini**

APOIO FINANCEIRO

CAPES

FAEP/UEL

CNPq

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Prof. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

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

AGRADECIMENTOS

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

A minha família, pela confiança e motivação.

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

Aos meus amigos: Celso Luiz Borges, Talita Perdigão Domiciano, Juliane Alves, Andréia A. Suzukawa e Ana Flavia Specian pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao laboratório NIP V, em especial a Profa. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta, aos colegas Dr^a Viviane K. Graça-de-Souza, Paulo Roberto Ceridório Corrêa e ao técnico Ediel Clementino da Costa.

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

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

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

Aos técnicos de laboratório Jesus Antônio Vargas e Maria Lúcia Camilo de Almeida pela disponibilidade e amizade.

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

Aos que não impediram a finalização deste estudo.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> : Posição Taxonômica, Morfologia e Ciclo de Vida.....	14
1.2 Doença de Chagas humana e experimental.....	17
1.3 Desenvolvimento da anemia na Doença de Chagas experimental.....	21
1.4 Estresse oxidativo na Doença de Chagas experimental.....	22
1.4.1 Enzimas antioxidantes.....	25
1.4.2 Radicais livres e a infecção por <i>T. cruzi</i>	27
1.5 Prostaglandinas e infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivos gerais.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
2.2.1 Avaliar o papel das prostaglandinas sobre o curso da infecção experimental com <i>T. cruzi</i> realizando o bloqueio farmacológico <i>in vivo</i> com inibidor específico de COX-2, celecoxibe, Asa inibidor de COX-1, e COX-2 e indometacina inibidor preferencial de COX-1, determinando os níveis de parasitemia no sangue e no coração e sobrevida de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> ;.....	34
2.2.2. Correlacionar os níveis de parasitemia com o desenvolvimento da anemia;.....	34
2.2.3 Avaliar o estresse oxidativo por meio da determinação do consumo de oxigênio, tempo de indução (T ^{ind}) e quimiluminescência (QL) e ao mesmo tempo averiguar a participação das prostaglandinas como possíveis mediadores da lesão pré-hemolítica em eritrócitos provenientes de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (susceptíveis) à infecção com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> ;.....	34

2.2.4 Analisar o efeito in vivo da inibição de COX-1 ou de COX-2 sobre a produção espontânea de óxido nítrico (NO) por macrófagos oriundos de camundongos infectados.com <i>T. cruzi</i>	34
3. CONCLUSÕES.....	35
3.1 A utilização de inibidores de COX-2 aumenta significativamente a parasitemia no sangue e no tecido cardíaco e diminuem a taxa de sobrevivência de ambas as linhagens de camundongos utilizadas;.....	36
3.2 O desenvolvimento da anemia e da hipoplasia medular observada em camundongos C57BL/6 e BALB/c durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> independe das PGs;.....	36
3.3 Em camundongos C57BL/6 o tratamento com inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibe), atenuou a trombocitopenia e a leucopenia e acentuou a reticulocitose;.....	36
3.4 Em camundongos BALB/c o tratamento com inibidor preferencial de COX-1 (indometacina), acentuou a reticulocitose;.....	36
3.5 Todos os três inibidores de ciclooxigenase utilizados atenuaram a lipoperoxidação de eritrócitos de camundongos C57BL/6 infectados, mas não atenuaram os de camundongos BALB/c;	36
3.6 A partir desses resultados, nós sugerimos que a liberação de prostaglandinas através da ciclooxigenase induzível é um dos fatores centrais para a proteção tecidual e para danos pré-hemolíticos de eritrócitos na doença de Chagas experimental.	36
4. REFERÊNCIAS	37
5. MANUSCRITO.....	46

1. RESUMO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: Drogas antiinflamatórias não esteróides (NSAIDs) são amplamente utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. O mecanismo de ação das NSAIDs resulta do bloqueio da produção de prostaglandinas (PG) por inibição da ciclooxigenase (COX), expressa de forma constitutiva (COX-1) e induzida (COX-2) em resposta a mitógenos, citocinas e microorganismos. No presente trabalho, nós investigamos o efeito de diferentes NSAIDs sobre o curso da infecção experimental com *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas.

MÉTODOS: Camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (susceptíveis) foram infectados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguícolas de *T. cruzi* (Cepa Y) e 4 horas depois tratados com indometacina (Indo, 1,2 mg/Kg, inibidor preferencial de COX-1), aspirina (Asa, 50 mg/Kg, inibidor preferencial de COX-1) ou celecoxibe (50 mg/Kg, inibidor preferencial de COX-2) pela mesma via. A partir do 5º dia de infecção, foram determinados os níveis parasitêmicos e a taxa de sobrevivência dos animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos. A análise do estresse oxidativo por quimiluminescência iniciada por *tert*-butil hidroperóxido permitiu a análise da integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e dos níveis de lipoperóxidos de membrana existentes nos eritrócitos de camundongos infectados com o *T. cruzi*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O bloqueio da produção de PG com os inibidores não seletivos para COX-1/COX-2 e seletivos para COX-2, provocaram o aumento da carga parasitária no sangue dos camundongos C57BL/6 (resistentes) e mortalidade de 100% no décimo segundo dia de infecção. Em relação aos camundongos BALB/c (susceptíveis), o tratamento com celecoxibe aumentou a parasitemia no sangue enquanto que o tratamento com indometacina ou aspirina provocou uma tendência de redução nos níveis de parasitemia, mas não foi capaz de aumentar a sobrevida dos mesmos. A análise histopatológica do tecido cardíaco obtido de camundongos dos grupos experimentais e controles revelou a existência de um aumento no número de ninhos de amastigotas no coração de camundongos C57BL/6 infectados e que foram tratados com Asa ou com celecoxibe (dia 12 pós-infecção). O tratamento desses animais com Indo provocou uma tendência de aumento no parasitismo cardíaco, mas não foi significativo estatisticamente. Constatamos ainda que o uso das NSAIDs provocou um aumento significativo no número de ninhos de parasitos no coração dos camundongos BALB/c em comparação aos camundongos controles (infectados e não tratados). As curvas de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 e BALB/c mostraram que o tratamento com indometacina provocou a morte de 100% dos camundongos C57BL/6 precocemente (12º dia de infecção), mas não foi capaz de modificar a taxa de mortalidade dos camundongos BALB/c (100%, no 28º dia de infecção). O bloqueio preferencial da COX-2 com celecoxibe aumentou a carga parasitaria ($P < 0,001$) e provocou a morte dos camundongos C57BL/6 (resistentes), mas não alterou o curso da infecção em camundongos BALB/c tratados ($P > 0,05$). Nossos resultados mostram que a anemia que se desenvolve na fase aguda da infecção experimental com o *T. cruzi* não é modificada com o bloqueio farmacológico de COX1 ou de COX-2. Contudo, a trombocitopenia e leucopenia que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi*, foram atenuadas nos camundongos C57BL/6 tratados com celecoxibe ($208 \pm 53 \times 10^6$ plaquetas/mL vs $450 \pm 86 \times 10^6$ plaquetas/mL e $2,4 \pm 1,1 \times 10^3$ leucócitos/mL vs $4,5 \pm 0,7$ leucócitos/mL, $P < 0,001$, respectivamente).

A infecção com o *T. cruzi* provocou aumento na porcentagem de reticulócitos no sangue periférico dos camundongos C57BL/6 em relação aos camundongos normais ($12,5 \pm 1,4$ vs $7,6 \pm 0,6$). Os camundongos C57BL/6 infectados e tratados com celecoxibe apresentaram no dia 12 pós infecção um aumento no número de reticulócitos ($22 \pm 2,2$ vs $12,5 \pm 1,4$) em relação aos controles (infectados não tratados), o que não foi verificado com os outros inibidores de COX utilizados. A infecção também provocou aumento na porcentagem de reticulócitos no sangue periférico dos camundongos BALB/c em comparação aos animais normais ($14,0 \pm 1,5$ vs $6,8 \pm 2,9$). O tratamento com indometacina aumentou cerca de 1,5 vezes a porcentagem de reticulócitos no sangue daqueles animais. Estes dados sugerem que produtos do metabolismo gerados via COX-2 estariam suprimindo a produção de reticulócitos durante a fase aguda da infecção experimental com o *T. cruzi*. Em adição, nossos dados mostram claramente que macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c infectados produzem espontaneamente muito menos óxido nítrico (NO) em relação aos macrófagos oriundos de camundongos C57BL/6 também infectados. O aumento da carga parasitária e morte precoce dos camundongos C57BL/6 e a tendência de queda da parasitemia e prolongamento da sobrevivência dos camundongos BALB/c, quando tratados com indometacina ou Asa podem ser mais bem compreendidos quando consideramos as diferenças na produção de NO mencionadas anteriormente e os efeitos dos diferentes inibidores utilizados sobre a produção de NO. O tratamento com indometacina não modificou a produção espontânea de NO por macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6, mas provocou o aumento da produção de NO em macrófagos obtidos de BALB/c (que apresentaram tendência de diminuição da parasitemia no sangue e no aumento da sobrevivência). Já o tratamento com Asa provocou diminuição da produção de NO por macrófagos de camundongos C57BL/6 (esses apresentaram 50% de morte no período do experimento). O tratamento de camundongos BALB/c infectados com Asa provocou aumento de NO o que poderia explicar a tendência observada no controle da parasitemia por parte destes animais. Em adição, há evidências sugerindo que as miocardites chagásicas são devidas aos danos induzidos pelo estresse oxidativo, podendo contribuir para a evolução da doença de Chagas em humanos e animais de laboratório. Em doenças infecciosas, a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) é, principalmente, derivada de danos celulares mediados pela invasão e replicação do patógeno e por reações citotóxicas mediadas pelo sistema imunológico. No entanto, como as ROS são formadas e sua função no estresse oxidativo na cardiomiopatia chagásica (CCM) não estão completamente elucidadas. As evidências atuais dão ênfase para as anormalidades mitocondriais como a disfunção da cadeia de transporte de elétrons para explicar o aumento do estresse oxidativo na doença de Chagas. A análise do estresse oxidativo por quimiluminescência iniciada por *tert*-butil hidroperóxido, mostrou claramente que o estresse oxidativo em eritrócitos que se desenvolve no camundongo C57BL/6 infectado com *T. cruzi* é atenuado com o bloqueio farmacológico tanto de COX-1 como de COX-2. Em relação ao camundongo BALB/c a quimiluminescência mostrou que o tratamento com as NSAIDs utilizadas não foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em eritrócitos de camundongos infectados. Estes dados sugerem que o mecanismo gerador do estresse oxidativo que ocorre na fase aguda da infecção com *T. cruzi* depende da capacidade do hospedeiro em responder à infecção por meio da alta produção de NO e ROS.

CONCLUSÕES: Nossos dados não deixam dúvidas de que na fase inicial da infecção com *T. cruzi* ocorre um aumento da lipoperoxidação de eritrócitos. Mostramos que o bloqueio de COX atenua a lipoperoxidação de eritrócitos no início da infecção com *T. cruzi* (12º dia pós-infecção).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CAT	Catalase
CCM	Cardiomiopatia chagásica
cDNA	DNA complementar
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase do tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
DC	Doença de Chagas
DCH	Doença de Chagas Humana
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GPI	Glico-fosfatidil inositol
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GSR	Glutaciona redutase
IFN	Interferon
MDA	Malondialdeído
NK	“Natural Killer”
NO	Nitric Oxide - Óxido Nítrico
NOS	Nitric Oxide Synthase - Óxido Nítrico Sintase
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs - Drogas antiinflamatórias não-esteróides
PAMPs	Padrão de seqüências moleculares associadas ao patógeno
PG	Prostaglandins - Prostaglandina
PGE ₁	Prostaglandina da classe E ₁
PGE ₂	Prostaglandina da classe E ₂
ROI	Reactive intermediates from oxygen - Intermediários reativos de oxigênio
ROS	Reactive oxygen species - Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β
Th1	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 1
TLR	Toll like receptor - Receptor de toll-like

TNF	Tumor necrosis factor - Fator de Necrose Tumoral
TS	Trans-sialidase
IL-1	Interleucina do tipo 1
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
QL	Quimiluminescência
T ^{ind}	Tempo de indução

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Trypanosoma cruzi: Posição Taxonômica, Morfologia e Ciclo de Vida.

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado, segundo Levine *et al.* da Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela contendo DNA e localizada na mitocôndria (DE SOUZA, 1984; DE SOUZA 2000). Seu ciclo de vida envolve a passagem alternada em hospedeiros vertebrados e em invertebrados da Classe *Hemiptera*, Família *Reduviidae* e Sub-Família *Triatominae*.

O ciclo de vida de *T. cruzi* tem sido o foco de excelentes revisões (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984; VICKERMAN, 1985; BURLEIGH & ANDREWS, 1995; TYLER & ENGMAN, 2001). Em seu ciclo, *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas, as quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984). Na forma tripomastigota (estágio infectante do parasito) o cinetoplasto situa-se posterior ao núcleo, em posição terminal ou subterminal, e o flagelo emerge da chamada bolsa flagelar, de localização próxima ao cinetoplasto; nos epimastigotas (formas de multiplicação no inseto e em culturas axênicas) o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo; por fim, os amastigotas (estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras de mamíferos) são formas arredondadas que apresentam um flagelo curto, de difícil visualização (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984, BURLEIGH & ANDREWS, 1995; TYLER & ENGMAN, 2001).

Os transmissores de *T. cruzi* são insetos estritamente hematófagos. Ao ser ingerido pelo vetor, as formas tripomastigotas presentes no sangue de vertebrados infectados, passam por uma seqüência de diferenciação ao longo do tubo digestivo do inseto, transformando-se em formas epimastigotas; por fim, os epimastigotas atingem o reto, onde se diferenciam em

tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados com as fezes e urina do vetor e podem penetrar no hospedeiro

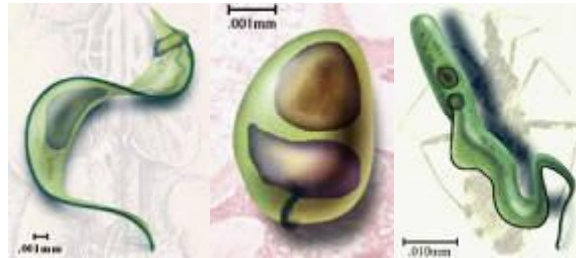


Figura 1. Formas evolutivas do *T. cruzi*: tripomastigota, amastigotas e epimastigotas.

vertebrado pelas mucosas (BRENER, 1973; PEREIRA, 1990; TYLER & ENGMAN, 2001). O ciclo evolutivo de *T. cruzi* no vetor é influenciado por vários fatores, tais como: a espécie do inseto, a cepa do parasita, número de parasitas ingeridos e fatores ambientais (BRENER, 1973). A contaminação das mucosas e do ferimento provocado pela “picada” do inseto com as fezes contendo as formas tripomastigotas metacíclicas leva à infecção. Recentemente, foi mostrado que a rota anatômica preferencial utilizada pelo *T. cruzi* após invasão da conjuntiva envolve a passagem dos parasitas através do ducto nasolacrimal para a cavidade nasal (GIDDINGS, *et al.*, 2006).

Independente do mecanismo de transmissão de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas devem necessariamente penetrar no interior de células, onde se diferenciam em amastigotas. Após um período de latência, ocorrem várias divisões binárias, e os amastigotas se transformam em tripomastigotas. Com o rompimento da célula parasitada, os tripomastigotas liberados podem infectar células vizinhas ou atingir órgãos e tecidos distantes, através da corrente circulatória, reiniciando o ciclo acima descrito (BURLEIGH & ANDREWS, 1995).

As formas tripomastigotas são as formas que invadem as células do hospedeiro por um mecanismo que envolve o acoplamento do parasita à membrana citoplasmática através de um

padrão de seqüências moleculares associadas ao patógeno (PAMPs), como por exemplo âncoras de GPI que são reconhecidos por receptores “Toll-like” do complexo TLR2 – TLR6 e TLR4 (GAZZINELLI & DENKERS, 2006), recrutamento e fusão dos lisossomos com esse ponto da membrana (TARDIEUX *et al.*, 1992; BURLEIGH & WOLLSLEY, 2002), permitindo formação de um vacúolo e a entrada do parasita (ANDRADE & ANDREWS, 2005). O pH ácido dentro desse vacúolo estimula a secreção, pelo parasita, de uma molécula chamada Tc-Tox, que permite a saída do parasita para o citoplasma da célula (ANDREWS, 1993).

T. cruzi não é uma população homogênea e está constituído por diferentes cepas que apresentam grande variabilidade bioquímica e comportamento biológico, isso tem dificultado os estudos de caracterização taxonômica das diferentes cepas, ao nível molecular e a utilização de drogas no tratamento de pacientes chagásicos (BRENER & GAZZINELLI, 1997). Os diferentes isolados e clones de *T. cruzi* foram agrupados em duas linhagens filogenéticas principais, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, através de marcadores bioquímicos e moleculares (ANÔNIMO, 1999). As cepas CL e Y, do grupo *T. cruzi* II infectam quatro vezes mais as células humanas do que as cepas do grupo I (F, Tulahen, M226, Sylvio-X10, Dm28c), que estão freqüentemente associadas ao ciclo silvestre de transmissão. Mais recentemente, os clones e populações estudados têm sido agrupados, mediante estudos de perfil molecular e izoenzimático, em três grandes grupos ou linhagens, denominados GI e GIII (grupos basicamente de origem silvestre, naturalmente vinculado a marsupiais) e Z2 (encontrado na DCH – Doença de Chagas Humana - da América do Sul, naturalmente ligados a primatas) (ZINGALES *et al.*, 1999; DE SOUZA, 2000).

Algumas cepas mostram preferências ou “tropismos” por diferentes tecidos, como foi mostrado em camundongos infectados com diferentes amostras de *T. cruzi* examinados na fase aguda da infecção (MOROCOIMA *et al.*, 2006). Estudos revelaram que algumas cepas

invadem principalmente células musculares (musculatura lisa e estriada), enquanto outras, como a cepa Y, mostram uma preferência por células macrofágicas de baço, fígado e medula óssea (MELO & BRENER, 1978).

1.2 Doença de Chagas humana e experimental

Em 1909 Carlos Chagas descreveu o primeiro caso humano da doença causada por *T. cruzi*, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC) (CHAGAS, 1909).

Embora a melhora nas condições de moradia e a iniciativa do Cone Sul no combate à doença de Chagas tenham contribuído para o declínio na transmissão da infecção nos países endêmicos (SCHOFIELD & DIAS, 1999), a DC continua sendo um grave problema de saúde pública e atualmente a Organização Mundial de Saúde estima que de 11 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, especialmente na América Latina (WHO, 2002). Esta endemia encontra-se condicionada ao nível econômico e social da região e em particular a existência de vetores domiciliares. No entanto, dados conhecidos sobre a transmissão congênita e por transfusão de sangue, somados aos movimentos migratórios das pessoas infectadas, sugerem a possibilidade de transformação da tripanossomíase americana, de endemia rural em enfermidade urbana (KIRCHHOFF, 1993; SCHMUNIS, 1999; GOLDBAUM *et al.*, 2004).

A infecção caracteriza-se pela existência de uma fase aguda, na qual a parasitemia patente é comumente observada seguida por uma fase crônica, onde a carga parasitária é controlada sem que haja completa eliminação dos parasitos. No homem a fase aguda da infecção geralmente é pouco sintomática. Na fase crônica, 30% dos indivíduos infectados desenvolvem patologias que podem se manifestar por insuficiência cardíaca, distúrbios do ritmo e da condução cardíacos, ou dilatações do trato digestório (ANDRADE, 1999).

Como mencionado, o protozoário pode ser transmitido por via congênita, transplante de órgãos e transfusões sanguíneas (BRENER, 1973; DIAS, 1979; DIAS, 2006). Embora muitos países da América Latina adotem a triagem sorológica para doença de Chagas nas doações de sangue, estima-se que de 0,1% a 24,4% das infecções com *T. cruzi* ocorrem através de transfusão sanguínea (WHO, 2002).

A terapêutica da Doença de Chagas é limitada basicamente a dois fármacos (CANÇADO, 1997). É consenso geral que o nifurtimox (*Lampit*, Bayer) e o benzonidazol (*Rochagan*, Roche) são capazes de curar de 70 a 100% dos chagásicos na fase aguda. Na fase crônica em que se encontram em geral os pacientes, o quadro é diferente, e as taxas de cura comprovadas variam de 6 a 36,5% dos casos (CANÇADO, 1997). Isso não quer dizer que tudo está resolvido. Há ainda sérias dificuldades a vencer, a começar pela alta toxicidade dos medicamentos ativos e pela incerteza ainda reinante na apreciação do grau de eficiência terapêutica, na fase crônica.

Não foi possível ainda produzir uma vacina contra *T. cruzi*, que pudesse ser utilizada em humanos. Embora antígenos do parasito ou de outros tripanossomatídeos, quando testados em camundongos, tenham sido considerados candidatos a compor essa vacina (BRENER & KRETTLI, 1990; BREGANO *et al.*, 2003; PINGE-FILHO *et al.*, 2005). No entanto, uma nova esperança surgiu pela possibilidade de se utilizar um plasmídeo contendo uma seqüência de DNA complementar (cDNA) que codifique uma proteína antigênica. Este, uma vez inoculado pode gerar uma resposta celular e humoral forte e de grande duração contra o organismo que expresse a referida proteína (vacina de DNA). Utilizando-se desta técnica, Costa e colaboradores (1998) e mais recentemente Machado e colaboradores (2006), mostraram que a imunização de camundongos com um plasmídeo, contendo seqüências gênicas codificadoras para o sítio catalítico da trans-sialidase e da proteína dois de formas amastigotas (ASP-2) de *T. cruzi*, gerou uma resposta imunológica mediada por anticorpos e

células T. Quando desafiados com formas tripomastigotas sanguíneas, os animais imunizados apresentaram parasitemia e mortalidade reduzida.

A fase aguda da infecção chagásica experimental realizada em camundongos apresenta características similares à fase aguda humana, com alta parasitemia e infiltrados inflamatórios em diversos tecidos, incluindo o coração e músculo esquelético. Alguns autores foram capazes de desenvolver modelos experimentais de fase crônica (LAGUENS *et al.*, 1980, GONÇALVES *et al.*, 1982).

Nos modelos murinos, o curso da infecção varia amplamente com a raça, idade, via de inoculação e sexo do hospedeiro (GOBLE, 1951; HAUSCHKA, 1974). TRISCHMAN e colaboradores (1978) trabalhando com diferentes linhagens de camundongos isogênicos, verificaram a existência de um padrão variável de susceptibilidade e de resistência à infecção chagásica. Dependendo da cepa podem ocorrer variações no curso da infecção (CORSINI *et al.*, 1980; ANDRADE *et al.*, 1985). Camundongos C57BL/6, referidos como resistentes, quando infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, mostram-se extremamente susceptíveis à infecção (SILVA *et al.*, 1992). Quando se utiliza a cepa SylvioX10 os camundongos C3H e C57BL/6, descritos como susceptíveis e resistentes a essa cepa, respectivamente, apresentam respostas opostas a esse padrão de susceptibilidade e resistência (POSTAN *et al.*, 1983). Portanto, como a base genética de susceptibilidade e resistência não é totalmente conhecida, é inapropriado referir-se a uma determinada linhagem de camundongo como susceptível ou resistente sem referência à cepa de *T. cruzi* utilizada para estabelecer a infecção (TARLETON, 1995).

Camundongos C57BL/6 e BALB/c são modelos para estudo de resistência e susceptibilidade, respectivamente, a várias doenças infecciosas. Em muitos casos, a

resistência do C57BL/6 é devido ao efeito microbicida do óxido nítrico produzido por macrófagos em resposta ao IFN- γ e ao TNF (SANTOS *et al.*, 2006).

No modelo murino da doença de Chagas, a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção é dependente tanto da imunidade inata quanto adquirida e está diretamente ligada ao padrão de produção de citocinas (DOS REIS, 1997; ABRAHAMSOHN, 1998; ROGGERO *et al.*, 2002) o qual é crítico para a ativação de macrófagos e controle do parasitismo durante as primeiras semanas após a infecção com *T. cruzi*.

Nesse contexto a interleucina 12 (IL-12) é considerada essencial para o estabelecimento de uma imunidade mediada por células protetora durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1998), pois essa citocina é capaz de estimular as células NK (“natural killer”) e células T a secretar IFN- γ , que exerce papel fundamental na ativação dos macrófagos para a produção de TNF- α (MUÑOZ-FERNANDES *et al.*, 1992), que em conjunto com o IFN- γ estimula o macrófago a produzir óxido nítrico (NO), o principal efetor que controla a replicação intracelular do parasita (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1995).

A produção de outros mediadores inflamatórios, como por exemplo, IL-1 (TARLETON, 1988), IL-6 (CARDONI *et al.*, 1997) e metabólitos decorrentes da via da ciclooxigenase (COX) está também aumentada (CARDONI & ANTÚNEZ, 2004).

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

Por outro lado a interleucina 10 (IL-10) e o fator transformador do crescimento- β (TGF- β) possuem atividade reguladora negativa sobre aos mecanismos tripanocidas (SILVA

et al., 1992). Possivelmente esse efeito inibitório da IL-10 sobre a produção de IFN- γ e conseqüentemente sobre a produção de TNF- α consista em um mecanismo endógeno de prevenção de choque endotoxêmico promovido por altas concentrações de TNF- α (ABRAHAMSOHN, 1998).

Após a fase aguda da infecção, a ativação de células T CD $_4^+$ e T CD $_8^+$ e conseqüente produção de anticorpos líticos específicos e citocinas (Th1), moduladoras da função dos macrófagos, determina o controle da parasitemia pelos componentes da imunidade adquirida específica (DOS REIS, 2000).

1.3 Desenvolvimento da anemia na Doença de Chagas experimental

Carlos Chagas, em seu trabalho pioneiro descrevendo a Tripanossomíase Americana, notou que crianças infectadas apresentavam profunda anemia. Camundongos experimentalmente inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam além da anemia, trombocitopenia (CARDOSO & BRENER, 1980) e leucopenia (MARCONDES *et al.*, 2000). Essas alterações hematológicas estão associadas a altos níveis de parasitemia, revertendo a valores normais quando a parasitemia é controlada, por exemplo, pelo nifurtimox, como mostrado por Marcondes e colaboradores (2000). Esses pesquisadores postularam que a anemia e a trombocitopenia durante a fase aguda da infecção pode ser conseqüência da supressão induzida por mediadores inflamatórios liberados por precursores mielóides.

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

fator de virulência presente em *T. cruzi* que provoca trombocitopenia em camundongos infectados.

O fato de que a inoculação da cepa Y de *T. cruzi* em camundongos resistentes à infecção provoca, na fase aguda, anemia mais severa do que em animais susceptíveis (MALVEZI *et al.*, 2004) e que as citocinas, como o TNF- α , podem provocar efeito supressivo sobre os precursores eritróides na medula (ROODMANN *et al.*, 1987; MALVEZI *et al.*, 2004) durante a infecção experimental com *T. cruzi*, sugerem que as alterações hematológicas observadas podem ser consequência tanto da ação supressora dos mediadores produzidos por macrófagos durante a fase aguda (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995; PINGE-FILHO *et al.*, 1999) quanto dos componentes da imunidade do animal infectado (MARCONDES *et al.*, 2000).

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

1.4 Estresse oxidativo na Doença de Chagas experimental

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

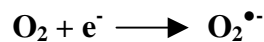
moléculas transformando-as em moléculas reativas capazes de transferir elétrons para outras moléculas não radicais, tornando-as radicais.

Os principais radicais livres são: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}), halaminas, oxigênio singleto, entre outros. As células possuem mecanismos antioxidantes como enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase que as protegem da ação desses radicais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Quando a formação dos radicais livres excede a capacidade da célula de removê-los, os efeitos lesivos desses radicais tornam-se predominantes gerando estresse oxidativo. A origem desses radicais está representada nas equações abaixo (BABIOR, 1997).

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



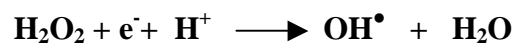
Mas se os elétrons são transferidos um a um para o oxigênio, uma série de produtos parcialmente reduzidos são gerados. O primeiro desses produtos é o superóxido ($O_2^{\bullet-}$):



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



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



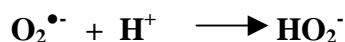
Finalmente, o quarto elétron produz a segunda molécula de água a partir do radical hidroxila:



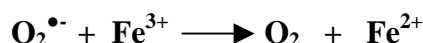
Ao contrário da maioria das moléculas com elétrons não pareados, o ânion superóxido é surpreendentemente inerte e sua principal reação é com outra molécula de superóxido para formar água oxigenada:



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



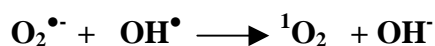
Esses radicais formados nessas reações também participam de outras reações como a reação de Haber-Weiss:



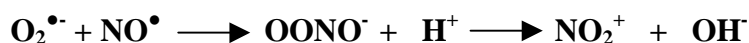
e a reação de Fenton:



O superóxido também reage com hidroxila para formar oxigênio singleto:



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



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

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

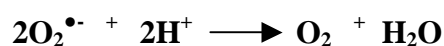


1.4.1 Enzimas antioxidantes

A remoção dos radicais livres em células de mamíferos, é realizada principalmente por quatro enzimas que compreendem 3 sistemas :

1.4.1.1 Superóxido dismutase (SOD).

Essa enzima catalisa a conversão do superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em oxigênio e água:

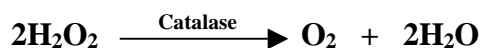


Embora a dismutação espontânea seja rápida, a SOD acelera bastante a reação (FRIDOVICH, 1995).

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

1.4.1.2 Catalase (CAT)

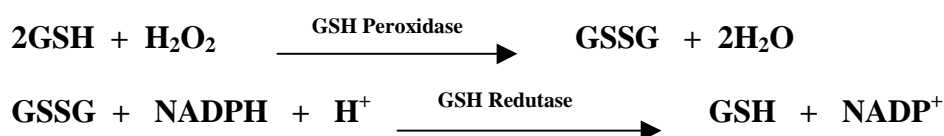
O peróxido de hidrogênio é controlado por dois sistemas, catalase e sistema antioxidante dependente de glutathione que convertem o peróxido em água às custas de NADPH. A catalase catalisa a transformação de H_2O_2 em água e oxigênio



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

1.4.1.3 Sistema antioxidante dependente de glutathiona.

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



1.4.1.4 Avaliação do estresse oxidativo

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

A membrana do eritrócito contém grande número de grupamentos tióis (R-SH) que podem ser convertidos em dissulfetos (R-SSG) pelos oxidantes, levando à desnaturação das proteínas de membrana (GILBERT & MC LEAN, 1990) com conseqüente lesão intracelular e oxidação da hemoglobina à metahemoglobina (RICE-EVANS & BAYSAL, 1987).

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

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (GARDÈS-ALBERT *et al.*, 1991).

A reação começa com a remoção do átomo de hidrogênio do ácido graxo polinsaturado da membrana celular pelo oxidante. Essa remoção pode ser feita pelo OH^\bullet ou

LO[•] (radical alcoxil), formando o L[•] (radical lipídico). O L[•] reage rapidamente com o O₂ formando LOO[•] (radical peroxil) que remove novo hidrogênio do ácido graxo formando novamente o L[•] e hidroperóxido lipídico (LOOH) que pode ser convertido em malondialdeído, um dos produtos finais da lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A lipoperoxidação termina quando os radicais L[•] e LOO[•] destroem a si próprios.

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

1.4.2 Radicais livres e a infecção por T. cruzi

Evidências da participação dos macrófagos no controle da infecção por *T. cruzi* foram mostradas nos experimentos de Hoff (1975) e Nogueira & Cohn (1978) que observaram que macrófagos de animais imunizados com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) apresentam atividade tripanocida aumentada quando comparada com os macrófagos de animais não imunizados.

A ativação dos macrófagos pelo BCG está associada a um aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) como, por exemplo, H₂O₂ (NATHAN, 1979). Porém o tratamento dos macrófagos com enzimas antioxidantes (SOD, CAT) ou benzoato de sódio, removedores de radicais livres produzidos pela explosão respiratória não inibe a atividade tripanocida (MCCABE & MULLINS, 1990) desses macrófagos. Mais tarde foi mostrado que a atividade tripanocida dos macrófagos é dependente principalmente da produção de óxido nítrico (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994).

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

Embora a atividade no controle da multiplicação do parasita seja dependente de NO, os intermediários reativos de oxigênio, (ROI), têm papel importante nas lesões teciduais ocorridas durante a infecção. Modificações na estrutura do retículo endoplasmático liso das células do hospedeiro, provavelmente devido à produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foram mostradas por Cecchini (1987).

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

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

Os ânions superóxido produzidos durante a infecção por *T. cruzi* também podem reagir com o NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) ou, pela reação de Fenton, podem gerar OH^{\bullet} , dois radicais altamente reativos que podem estar associados ao dano oxidativo nos eritrócitos observado durante a infecção experimental em camundongos C57BL6 e Swiss (MALVEZI *et al.*, 2004). Estes autores também sugerem, que nesse caso, o dano oxidativo no eritrócito pode ser dependente de um balanço entre os níveis de $O_2^{\bullet-}$ e NO^{\bullet} produzidos pelo hospedeiro.

Em adição, há evidências que sugerem que as miocardites chagásicas são devidas aos danos induzidos pelo estresse oxidativo, podendo contribuir para a evolução da doença de Chagas (ZACKS *et al.*, 2005). Em doenças infecciosas, a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) é, principalmente, derivada de danos celulares mediados pela invasão e replicação do patógeno e por reações citotóxicas mediadas pelo sistema imune.

No entanto, como as ROS são formadas e sua função no estresse oxidativo na cardiomiopatia chagásica (CCM) não estão completamente elucidadas. As evidências atuais dão ênfase para as anormalidades mitocondriais como a disfunção da cadeia de transporte de elétrons para explicar o aumento do estresse oxidativo na doença de Chagas (ZACKS *et al.*, 2005).

1.5 Prostaglandinas e infecção com *Trypanosoma cruzi*

Prostaglandinas (PGs) sintetizadas pelos macrófagos, principalmente PGE₂, constituem uma classe de ácidos graxos poliinsaturados, de grande importância imunofarmacológica, produzidos pela ação da enzima ciclooxigenase (COX) da prostaglandina sintase sobre o ácido aracdônico liberado de fosfolípidios de membrana celular (PARK *et al.*, 2006). Sua presença foi constatada pela primeira vez em 1930, mas as primeiras estruturas só foram elucidadas em 1962 (STRYER, 1995).

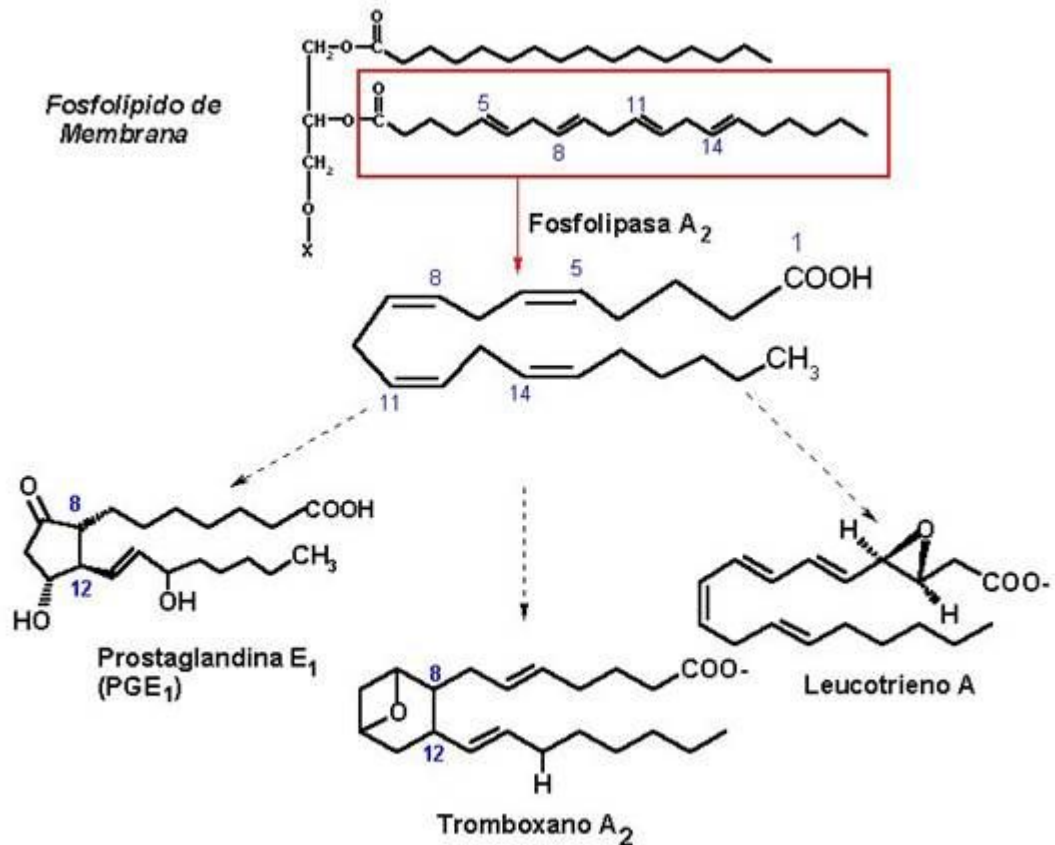


Figura 2. Origem das Prostaglandinas.

A COX pode apresentar-se em duas diferentes isoformas: COX-1 é a isoforma expressa de forma constitutiva, encontrada virtualmente em todos os tipos celulares dos mamíferos em um nível praticamente constante; COX-2 é praticamente indetectável na maioria dos tecidos, mas é rapidamente induzida em resposta a mitógenos, citocinas e endotoxinas (APLETON *et al.*, 1995).

Resumidamente, a síntese de PGE₂, tem início a partir do araquidonato, que possui quatro carbonos. Um anel ciclopentano é formado e quatro átomos de oxigênio são introduzidos pela COX. Todos os átomos de oxigênio introduzidos na PG vêm do oxigênio molecular. O componente hidroxiperoxidase da COX, catalisa uma redução por 2e⁻ de um

grupamento 15-hidroxiperoxi para um grupamento 15-hidroxila (descrito por STRYER, 1995).

Os macrófagos em particular, são capazes de produzir quantidades substanciais de imunomoduladores como as prostaglandinas da série E (PGE₂ e PGE₁), especialmente após ativação por estímulos inflamatórios (KUNKEL *et al.*, 1986^a). E sua síntese pode ser bloqueada por inibidores da ciclooxigenase, como drogas antiinflamatórias não-esteróides (NSAIDs) (MITCHELL *et al.*, 1994). Estes inibidores podem exibir três tipos diferentes de mecanismos: competitiva reversível, irreversível e reversível não competitiva (LANDS, 1981; MITCHELL *et al.*, 1994; HAWKEY, 1999;). Aspirina por exemplo, inativa irreversivelmente ambas COX-1 e COX-2 pela acetilação do grupo hidroxil de um resíduo de serina localizado no aminoácido 70 da região aminoterminal da enzima (ROTH *et al.*, 1975). Outro inibidor bastante utilizado, a indometacina, causa uma inibição da COX-1 e da COX-2, reversível competitiva ou não (KURUMBAIL *et al.*, 1996).

A PGE₂ tem múltiplos efeitos sobre o sistema imunológico, incluindo inibição da proliferação de células T murinas e de humanos (HASLER *et al.*, 1983), inibição da atividade de células NK (GOTO *et al.*, 1983), inibição da produção de IL-1, TNF- α (KUNKEL *et al.*, 1986^b). Foi mostrado também que PGE₂ inibe o desenvolvimento da resposta Th1 e secreção de citocinas Th1 específicas (IFN- γ , IL-2) (BETZ & FOX, 1991). PGE₂ também interfere nas interações *in vivo* entre monócitos e células T, gerando uma apresentação antigênica inadequada para células T e inibição da expressão de moléculas do MHC de classe II (STEPHAN *et al.*, 1988). Em geral as prostaglandinas funcionam como agentes imunossupressores, então, a capacidade de um antígeno induzir a liberação de PGE₂ pelos macrófagos pode influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 dominante e definir o estado de imunidade do hospedeiro (protetora ou não). Existem evidências de que a PGE₂ está aumentada em várias infecções parasitárias, tais como *Cryptosporidium parvum*

(ARGENZIO & RHOADS, 1997), *Toxoplasma gondii* (YONG *et al.*, 1994), *Leishmania donovani* (REINER & MALEMUD, 1985), *Leishmania major* (CILLARI *et al.*, 1986) e *T. cruzi* (CELENTANO *et al.*, 1995; PINGE-FILHO *et al.*, 1999; CARDONI & ANTÚNEZ, 2004).

Prostaglandinas (PGs) juntamente com NO e TNF- α participam de um complexo circuito que controla a linfoproliferação e produção de citocinas durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi* (PINGE-FILHO *et al.*, 1999). O efeito supressor de PGE₂/TGF- β sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias (FADOK, 1998) poderia criar um ambiente favorável para o crescimento de *T. cruzi* dentro dos macrófagos.

Ainda que a ocorrência de imunossupressão induzida com *T. cruzi* esteja bem documentada, os papéis exercidos pelas PGs no estresse oxidativo associado à anemia não foram ainda investigados. Em adição, estudos que utilizaram diferentes NSAIDs para determinar o papel das PGs no controle da carga parasitária e resistência à infecção com *T. cruzi* são discrepantes (CELENTANO *et al.*, 1995; PINGE-FILHO *et al.*, 1999; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; MICHELIN *et al.*, 2005).

Desta forma, estudos que buscam investigar o papel das PGs nos mecanismos de defesa e de geração de estresse oxidativo envolvidos na infecção por *T. cruzi* são essenciais para o melhor entendimento do desenvolvimento da doença de Chagas e podem indicar caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desta importante enfermidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar o efeito do bloqueio farmacológico de COX-1 e de COX-2 no curso da infecção experimental de animais na fase aguda da infecção com a cepa Y do *T. cruzi*, analisando parâmetros hematológicos, carga parasitária, produção de óxido nítrico e análise do estresse oxidativo em eritrócitos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o papel das prostaglandinas sobre o curso da infecção experimental com *T. cruzi* realizando o bloqueio farmacológico *in vivo* com inibidor específico de COX-2, celecoxibe, Asa inibidor de COX-1, e COX-2 e indometacina inibidor preferencial de COX-1, determinando os níveis de parasitemia no sangue e no coração e sobrevivência de camundongos infectados com *T. cruzi*;

2.2.2. Correlacionar os níveis de parasitemia com o desenvolvimento da anemia;

2.2.3 Avaliar o estresse oxidativo por meio da determinação do consumo de oxigênio, tempo de indução (T^{ind}) e quimiluminescência (QL) e ao mesmo tempo averiguar a participação das prostaglandinas como possíveis mediadores da lesão pré-hemolítica em eritrócitos provenientes de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (susceptíveis) à infecção com a cepa Y de *T. cruzi*;

2.2.4 Analisar o efeito *in vivo* da inibição de COX-1 ou de COX-2 sobre a produção espontânea de óxido nítrico (NO) por macrófagos oriundos de camundongos infectados com *T. cruzi*.

3. CONCLUSÕES

3.1 A utilização de inibidores de COX-2 aumenta significativamente a parasitemia no sangue e no tecido cardíaco e diminuem a taxa de sobrevivência de ambas as linhagens de camundongos utilizadas;

3.2 O desenvolvimento da anemia e da hipoplasia medular observada em camundongos C57BL/6 e BALB/c durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* independe das PGs;

3.3 Em camundongos C57BL/6 o tratamento com inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibe), atenuou a trombocitopenia e a leucopenia e acentuou a reticulocitose;

3.4 Em camundongos BALB/c o tratamento com inibidor preferencial de COX-1 (indometacina), acentuou a reticulocitose;

3.5 Todos os três inibidores de ciclooxigenase utilizados atenuaram a lipoperoxidação de eritrócitos de camundongos C57BL/6 infectados, mas não atenuaram os de camundongos BALB/c;

3.6 A partir desses resultados, nós sugerimos que a liberação de prostaglandinas através da ciclooxigenase induzível é um dos fatores centrais para a proteção tecidual e para danos pré-hemolíticos de eritrócitos na doença de Chagas experimental.

4. REFERÊNCIAS

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

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

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

ANDRADE, Z. Immunopathology of Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94: 71-80, 1999.

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

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

ANÔNIMO, Recommendations from a Satellite Meeting, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Vol. 94, Suppl. I: 429-432, 1999.

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.

ARGENZIO, R. A.; RHOADS, J. M. Reactive oxygen metabolites in piglet cryptosporidiosis. **Ped. Research** 41: 521-526, 1997.

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

BETZ, M.; FOX, S. B. Prostaglandins E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J. Immunol.** 146: 108-113, 1991.

BREGANO, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. K.; MENOLLI, R. A.; JANKEVICIUS, S. I.; PINGE-FILHO, P.; JANKEVICIUS, J. V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunol. Med. Microb.** 39 (3): 257, 2003.

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

BRENER, Z.; KRETTLI, A. U. Immunology of Chagas' Disease. In: **Modern Parasite Biology, Cellular, Immunological and Molecular Aspects** (Wyler, D. J., ed.), cap. 13, W.H. Freeman Company, USA, p. 247-261, 1990.

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

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

BURLEIGH, B. A; WOLLSLEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol.** 4(11): 701-711, 2002.

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

CARDONI, R. L.; ANTÚNEZ, M. I.; 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.

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

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

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

CELENTANO, A. M.; GORELIK, G.; SOLANA, M. E.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. PGE₂ involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. **Prostaglandins** 49: 141-153, 1995.

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

CILLARI, E., LIEW, F. Y., LELCHUK, R. Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.** 54: 386-394, 1986.

CORSINI, A. C.; COSTA, M. G.; OLIVEIRA, L. O.; CAMARGO, I. J.; STELINI, A. Jr. Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain y. **Rev. Inst. Med. Trop.** 22(4): 192-196, 1980.

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

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA, R. C.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 177(5): 3193-3200, 2006.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, 86: 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: Brener, Z., Andrade, Z. A.; Barral-Neto, M.(Eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 2000.

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

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

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

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

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

FADOK, V. A. Macrophages that have ingest apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production though autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **J. Clin. Invest.**, 101: 890-898, 1998.

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

FREIRE-de-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B. P.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; MELLO, F. G.; DOS REIS, G. A.; LOPES, M. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, 403: 199-203, 2000.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Biochem.** 64: 97-112, 1995.

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

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

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

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.

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

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

GOLDBAUM, M.; AJIMURA, F. Y.; LITVOC, J.; CARVALHO, S. A., ELUF-NETO, J. American trypanosomiasis and eletrocardiographic alterations among industrial workers in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 46(6): 299-302, 2004.

GOBLE, F. C. Studies on experimental Chagas' disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. **J. Parasitol.** 37: 408-414, 1951.

GONÇALVES, S., RIBEIRO DOS SANTOS, R., CAMPOS SOARES, A.M.V.; ROSSI, M.A. Modelo experimental de miocardite chagásica crônica em camundongos. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 18, 1982.

GOTO, T.; HERBERMAN, R. B.; MALUISH, A.; STRONG, D. M. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. **J. Immunol.** 130: 1350, 1983.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B. **Free radicals in biology and Medicine**. 4: 189-276, 1989.

HASLER, F.; BLUESTEIN, H. G.; ZVAIFLER, N. J.; EPSTEIN, L. B. Analysis of the defects responsible for the impaired regulation of EBV-induced B cell proliferation by rheumatoid arthritis lymphocytes. II Role of monocytes and the increase sensitivity of rheumatoid arthritis lymphocytes to prostaglandin E. **J. Immunol.**, 131: 768, 1983.

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

HAWKEY, C. J. COX-2 inhibitors. **Lancet** 353: 307-314, 1999.

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

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

KIRCHHOFF, L. V. American Trypanosomiasis (Chagas' disease) - A Tropical Disease now in the United States. **J. Med.**, 329:639-44, 1993.

KUNKEL, S. L.; WIGGINS, R. C.; CHENSUE, S. W.; LARRICK, J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E₂. **Res. Commun.**, 137: 404, 1986^a.

KUNKEL, S. L.; CHENSUE, S. W.; PHAN, S. H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. **J. Immunol.**, 136: 186, 1986^b.

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

LANDS, W. E. M. Actions of anti-inflammatory drugs. **Trends Pharmacol. SCI** 2: 78-80, 1981.

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

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

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

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

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

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

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

MITCHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Pharmacology** 90: 11693-11697, 1994.

MOROCOIMA, A.; RODRÍGUEZ, M.; HERRERA, L.; URDANETA-MORALE, S. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism of bone and cartilage. **Parasitol. Res.**, 99 (6): 663-668, 2006.

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

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

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

PALMER, R. M.; MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Res. Commun.** 158: 348-352, 1989.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. **Clin. Immunol.** 2006.

PEREIRA, M. A. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. Wyler, D. J. ed. W. H. Freeman & Company. N. Y. 64-78, 1990.

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

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

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

REINER, N. E.; MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: *in vitro* evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **J. Immunol.**, 134: 556-563, 1985.

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

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.

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

ROTH, G. J.; STANFORD, N.; MAJERUS, P. W. Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.** 72: 3073-3076, 1975.

SANTOS, J. L.; ANDRADE, A. A.; DIAS, A. A. M.; BONJARDIM, C. A.; TEIXEIRA, S. M. R.; REIS, L. F. L.; HORTA, M. F. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages in IFN- γ /LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. **J. Interf & Cytocine Res.**, 2006.

SCHANAIDER, A. Radicais livres: 'vilões' ainda em estudo. **Ciência Hoje**, 158: 60-62. 2000.

SCHOFIELD, D. B.; DIAS, J. C. The southern Cone Initiative against Chagas' Disease. **Adv. Parasitol.**, 42: 1-27. 1999.

SCHMUNIS, G. A. Risk of Chagas disease through transfusion in the Americas. **Medicina**, 59: 125-34 (suppl), 1999.

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

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

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

STEPHAN, R. N.; CONRAD, P. J.; SAIZAWA, M.; DEAN, R. E.; CHAUDRY, I. H. Prostaglandins E₂ depresses antigen-presenting cell function of peritoneal macrophages. **J. Surg. Res.**, 44: 733-739, 1988.

STRYER, L. **Bioquímica**. Ed. Guanabara Koogan. p. 811-812, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

VICKERMAN, K. Development cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **British Medical Bulletin**, 41: 105-114, 1985.

YONG, C. E.; CHI, E. Y.; HENDERSON Jr. W. R. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. **J. Exp. Med.** 180: 1637-1648, 1994.

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

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

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

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Vol. 94, Suppl. I: 159-164, 1999.

5. MANUSCRITO

Differential effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden and oxidative stress in erythrocytes from mice susceptible and resistant to *Trypanosoma cruzi* infection

Tatakihara VLH¹, Borges CL^{1,2}, Malvezi AD¹, Graça-de Souza VK³, Yamada-Ogatta SF³, Rizzo LV⁴, Cecchini R¹, Pinge Filho P^{1*}

¹Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

³Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo

Abstract

We investigated the effects of inhibition of COX-1 and COX-2 on control of parasite burden, and erythrocyte oxidative stressing during *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 and BALB/c mice. Mice were infected with 5×10^3 trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Y strain). After four hours, selected mice were treated or not with indomethacin (1.2mg/Kg/day) a preferential antagonist of COX-1, aspirin (50 mg/Kg/day) inhibitor of both COX and celecoxib (50mg/Kg/day) a COX-2 selective inhibitor. *Tert*-butyl hydroperoxide-initiated-chemiluminescence (CL) analysis carried out in non-lysed erythrocytes from *T. cruzi* infected-mice (12th day) showed a dramatic increase in CL indicating both reduced levels of antioxidants and increased erythrocyte membrane lipid peroxide. The COX-2 inhibitor employed, significantly increased the blood and cardiac tissue parasitemia and decreased the survival rate of both strains mice. All three cyclooxygenase inhibitors employed, reduced the lipid peroxidation in erythrocytes from C57BL/6 *T. cruzi*-infected-mice but not in BALB/c infected-mice. From these results, we propose that inducible cyclooxygenase-released prostaglandin is one of the pivotal factors to tissue-protective and pre-hemolytic damage of erythrocyte in the experimental Chagas' disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, cyclooxygenase, NSAIDs, anemia, oxidative stress, nitric oxide

* Corresponding author: Tel: + 55 43 3371-4267; Fax: + 55 43 3371-4465
E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.)

1. Introduction

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi is an intracellular parasite that causes American trypanosomiasis (Chagas' disease), characterized by a progressive inflammatory reaction mainly affecting the function of myocardial and skeletal muscles as well as the viscera of the digestive tract [1]. *T. cruzi* trypomastigotes can infect many different mammalian cell types in which they differentiate and multiply as amastigote forms. Macrophages can act both as host cells for the parasite and as effector cells in the anti-parasite immune responses [2,3].

The murine experimental infections usually show an acute stage with high parasitemia and prominent inflammatory infiltrates in several tissues, including the heart and skeletal muscles. At the moment, the mechanisms that induce this inflammatory reaction and its role in the resistance and/or the outcome of the disease are not fully understood. Several pro-inflammatory cytokines that tailor the protective immune response in the acute phase can play a role in its onset. In the early infection, host resistance depends on the T helper type 1 (Th1) protective response, [4] triggered by IL-12 and IL-18 [5] that synergistically activate T cells and natural killer cells to produce interferon gamma (IFN- γ) [6]. In turn, IFN- γ and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) stimulate phagocytic cells to destroy internalized parasites, mainly through nitric oxide (NO) generation [7], resulting in a raise of reactive intermediates from oxygen (ROS) [8] and reactive nitrogen species (RNS) [9]. The production of other inflammatory mediators, such as IL-1 [10] and IL-6 [11], and cyclooxygenase metabolites is also enhanced [12].

T. cruzi infection in mice is associated with severe hematological changes, including thrombocytopenia [13], neutropenia following by neutrophilia and eosinophilia [14], which may contribute to mortality. Similar hematological alterations have also been described in

experimental African trypanosomiasis [15] and are also common characteristic of human immunodeficiency virus infection [16] and malaria [17-19]. Marcondes and collaborators [20] showed that experimental acute *T. cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia and that these alterations can be prevented by nifurtimox (an anti-trypanosomal drug) treatment.

The mechanisms responsible for these hematological alterations are not clearly understood, but some studies have provided a molecular explanation for the pathological findings. There are evidences indicating increased oxidative stress in the course of Chagas' disease [21-24]. Our previous results revealed that nitric oxide (NO) does not play direct role in development of anemia during *T. cruzi* infection, but contribute together with TNF- α to oxidative pre-hemolytic damage of erythrocytes in infected mice [25]. Tribulatti and collaborators [26] demonstrated that the trans-sialidase (TS) from *T. cruzi* deplete the sialic acid from platelets, increasing its clearance and leading afterwards to a thrombocytopenia observed during acute phase of infection. In addition, it was shown that IFN-inducible p47GTPase (LRG-47) influence *T. cruzi* control by simultaneously regulating macrophage-microbicidal activity and hemopoietic function [27].

The cyclooxygenase-released prostaglandin involvement in the oxidative stress associated with anemia in the early of *T. cruzi* infection is not known and data about its role in the control of parasitism and resistance to *T. cruzi* infection are discrepant [28-31].

Prostaglandins (PGs) are synthesized from arachidonic acid by enzymes known as cyclooxygenases (COX) that exist in at least two isoforms, type 1 (COX-1), which is constitutive and type 2 (COX-2), which is induced by inflammatory mediators, mainly cytokines [32]. Prostaglandin E₂ (PGE₂) is a principal mediator of inflammation in diseases such as rheumatoid, osteoarthritis and cancer [32,33].

PGE₂ has no effect on or enhances the production of Th2 cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-10, by Th2 cells, but inhibits drastically the production of Th1 cytokines, such as IL-2 and its receptor [34,35] and IFN- γ by Th 1 cells [36].

There is evidence that PGE₂ synthesis is increased in several parasitic infections such as *Cryptosporidium parvum* [37], *T. gondii* [38], *Leishmania donovani* [39], *Leishmania major* [34], and *T. cruzi* [28-31,12].

However, PG and RNS, such as \bullet NO, along with reactive oxygen species (ROS) produced by activated macrophages have been implicated as mediators of tissue damage in numerous pathological conditions [40, 25], including regulation of lipid peroxidation [41].

The aim of this study was to compare the *in vivo* inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the parasitism, resistance, anemia, erythrocytes oxidative damage and NO production in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* (Y strain). In the acute phase, we observed an increased NO production associated with anemia and oxidative stress in erythrocytes in both mouse strains. A parallelism was observed between the *in vivo* inhibition of COX and reduction of oxidative stress in erythrocytes with increased on parasite burden associate a decrease in the production of NO by macrophages.

2. Material And Methods

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

2.1 Mice and reagents

Swiss mice were obtained from the breeding colonies of the animal facility of the Center for Biological Sciences at Londrina State University, Londrina, Brazil. C57BL/6 mice and BALB/c were obtained from the mouse breeding facilities of the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. We used 8 to 12 weeks old male mice in all experiments. Mice were maintained under standard conditions in animal facility within the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, Londrina State University. Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*. All procedures with the animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals.

Indomethacin (1-[p-chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid, $C_{19}H_{16}ClNO_4$, Sigma, St Louis, USA) was dissolved in absolute ethanol and diluted in RPMI 1640 (GIBCO BRL, USA) without serum. Separate experiments indicated that 0.005% ethanol did not alter responses from normal mice. Aspirin (2-acetoxybenzoic Acid, $C_9H_8O_4$, Biotec, Brazil) and celecoxib ([4 - [5 - (4-methylphenyl) - 3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide, $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$, Pfizer Pharmaceuticals, Porto Rico) were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) [26,27]. All reagents were prepared fresh every day and aliquots were stored at 4°C until used. Buffers and solutions were prepared in deionized water.

2.2 *Trypanosoma cruzi* infection, parasitemia and survival rates determination

The Y strain of *T. cruzi* [42] was kindly supplied by Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo (Institute of Biosciences, Campinas State University, Campinas, São Paulo, Brazil).

This strain was maintained by weekly intraperitoneally (i.p.) inoculation of Swiss mice with 2×10^5 blood trypomastigotes forms. Infective blood trypomastigotes were obtained from *T. cruzi*-infected mice by drawing blood via cardiac puncture following anaesthetization. Motile blood forms were counted and the desired number of parasites (5×10^3) was injected intraperitoneally (i.p.) in C57BL/6 and BALB/c mice. Parasitemia was assessed by counting circulating parasites in 5 μ L of blood obtained from a tail vein of infected mice. These data were expressed as the number of parasites per milliliter of blood. Parasitemia and survival rates were determined daily, beginning at the 5th day post infection [43].

2.3 Treatment of mice with cyclooxygenase inhibitors (NSAIDs)

Indomethacin (INDO) (1.2 mg/kg), aspirin (ASA) (50 mg/Kg) and celecoxib (50 mg/Kg) were injected i.p. in mice at a daily dose. Groups of 6-10 mice were used. C57BL/6 and BALB/c mice received the first dose 4 h after infection and were treated until they died; parasitemia and mortality were evaluated in the same period. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. In order to evaluate drug toxicity, normal mice were inoculated only with indomethacin, aspirin or celecoxib until 30 days, using the same treatment schedule. The dose of NSAIDs chosen for these experiments was based on previously published studies demonstrating its efficacy [28-30,44].

2.4 Hematological methods

Erythrocytes and leukocytes from normal and infected mice under ether anesthesia, were collected from cardiac puncture with heparinized needles and syringes and counted by standard methods [45]. Hemoglobin concentration was determined by the Drabkin method. Hematocrits were obtained by microcentrifugation of capillary tubes filled with heparinized

blood [46]. For enumerating reticulocytes, 40 μ l of heparinized blood was incubated with 20 μ l brilliant cresyl blue for 20 minutes at 37°C, and then thin blood smears were prepared on glass slides. After the blood smears air dried, reticulocytes were counted by light microscopy. All blood analysis and cell counts were performed 12 days post-infection. Platelets were counts from peripheral blood from normal and infected mice anaesthetized, in polypropylene tubes containing 3.8% (w/v) sodium citrate (citrate/blood ratio, 1:9) [26]. All the manipulations were carried out at room temperature. The number of platelets and blood cells were determined by manual counting with a Neubauer hemocytometer.

2.5 Bone marrow cells harvest

Bone marrow cells were harvested by flushing the femoral shafts with ice-cold PBS, as previously described [47]. The total number of cells collected was determined by manual hemocytometer count. For differential counts, cell suspensions from uninfected and day 12-infected mice were deposited on glass slide, stained with May Grünwald-Giemsa, then counted by light microscopy.

2.6 Histopathological analysis

On day 12 of infection, mice treated or not with NSAIDs were sacrificed. The heart was removed, fixed in 10% buffered formalin, were paraffin embedded, than sections were stained with hematoxylin/eosin (HE), and then analysed by light microscopy. The number of parasite nests was counted in 50 microscope fields (400x magnification) per tissue section. Three sections were counted and the results were expressed as the mean of them.

2.7 Macrophages cultures and quantification of nitrite (NO_2^-)

Peritoneal cells (PCs) were prepared from normal and infected (day 12 pi) mice treated or not with NSAIDs. Four days after i.p. injection of 1.5 mL of 5% thioglycollate to BALB/c and C57BL/6 mice, cells were harvested from the peritoneal cavity by injecting cold PBS, centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C, resuspended in RPMI1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, CRILON), 50 mg/mL gentamicin, 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin and 2 mM glutamine. The PCs suspension was dispensed into 48-well tissue culture plates (10^6 cells/ml) for 4 h to allow the cells to adhere to the plastic surface, followed by washing with warm PBS to remove nonadherent cells. For each experiment, PCs from three mice were pooled.

Macrophage monolayers from C57BL/6 and BALB/c mice were incubated in the presence of Asa (10 mM), Indo (10 μM) or celecoxib (10 mM) [48,49]. Nitrite (NO_2^-) accumulation in 24-h supernatants of cultured cells was used as an indicator of NO production and was determined by the Griess reaction with sodium nitrite as a standard, as previously describe (detection limit: 1:56 μM) [50]. Fifty microliters of supernatant were incubated for 10 min, in the dark, at room temperature, with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid). The absorbance was determined at 540 nm.

2.8 Measurements of oxidative stress

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

Heparinized blood samples from uninfected and infected mice (day 12 post-infection) were used for erythrocyte oxidative stress determinations. After removal of plasma and white cells from whole blood, the remaining erythrocytes were washed twice with a 10 mM sodium

phosphate buffered saline (0.9% NaCl, pH 7.4), and then resuspended in the same buffer (1:99, v/v). Both *t*-butyl hydroperoxide 2 mM (*t*-BHT) induced oxygen uptake and induction time were measured with a Clark-type oxygen electrode at 37°C [51]. The induction time is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity, while oxygen uptake is an indirect measure of the susceptibility of erythrocytes membranes to lipid peroxidation elicited by *t*-BHT [52].

2.8.2 *Tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (CL) and protein concentration*

Mouse heparinized blood erythrocytes from different experimental groups were sedimented by centrifugation (800 g, 10 min) at 25°C, and then washed twice with saline. Erythrocytes 1% suspension was prepared with 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate at the moment of its use. The chemiluminescence reaction (CL) was initiated by the addition of 20 µL *tert*-butyl hydroperoxide at final concentration of 2 mM in 1 mL [53]. CL was measured in a Luminometer TD20/20 (Turner Biosystems, Sunnyvale CA, USA). The results were expressed in cpm/mg protein. The entire curve was used as an indicator of lipid peroxidation. The initial rate (V_0) was obtained in the ascending part of the CL curve [54]. Protein concentration was determination by the method of Lowry and collaborators [55] modified by Miller [56].

2.9 *Statistical analysis*

Arithmetic means (parasitaemia, amastigotes nests, and inflammatory foci) and standard deviations of means were calculated. The impact of infection and other treatments were determined by two-way analysis of variance (ANOVA). When significant main effects were noted, differences between individual groups were tested using Bonferroni multiple comparisons method. Survival curves were compared using the Mantel–Haenszel log rank

test. All statistical analysis was made using GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1 Effects of the daily treatment with cyclooxygenase inhibitors on parasitemia, and survival in infected mice.

To address the question of the involvement of prostaglandins in the protection during the acute phase of *T. cruzi* Y strain, two murine models of Chagas' disease were used. These vary with respect to the resistance (C57BL/6) and susceptibility (BALB/c) to the infection.

Fig. 1 and 2 shows the parasitemia (panel A) and the survival rate (panel B) of C57BL/6 and BALB/C mice infected with *T. cruzi*, treated or not with different NSAIDs, respectively. BALB/c infected with *T. cruzi* Y strain, were more susceptible than C57BL/6, reaching higher parasitemia and mortality. Parasitic load in the blood peaked 9 days post-infection was significantly higher in BALB/c compared to C57BL/6 mice and declined progressively thereafter. There were large and statistically significant differences ($P < 0.001$) in survival between all two strains of mice studied (Fig. 1 and Fig. 2, panel B). All of the C57BL/6 mice untreated survived the infection, while all of the BALB/c mice untreated died 26 days p.i. The treatment of infected C57BL/6 mice with ASA or celecoxib dramatically increased the blood parasites load starting from on the 7th to 9th day of infection, respectively (Fig 1, panel A, $P < 0,05$). ASA and celecoxib treatment showed no significant differences in parasitemia from the 17th p.i. C57BL/6 treated with Indo, ASA and celecoxib die from the 7th to 15th and to 22th day of infection, respectively. All C57BL/6 mice infected and treated with Indo died on day 12th (Fig 1, panel B). The survival rate in C57BL/6 treated with Asa or celecoxib was half and fully that in C57BL/6 untreated mice, respectively (day 30 p.i) and the

mean survival time was little longer in the C57BL/6 mice treated with celecoxib (Fig 1, panel B, $P < 0.001$).

The treatment of infected BALB/c mice with celecoxib dramatically increased the blood parasites load starting from on the 13th day of infection (Fig 2, panel A, $P < 0.05$). Asa and Indo treatment showed no significant differences in parasitemia on days 7, 14 and 21 p.i. All BALB/c mice infected and treated with celecoxib died on day 18th (Fig 2, panel B). BALB/c treated with Asa or Indo die from the 20th to 22th and 22th day of infection, respectively. The mean survival time was little smaller in the BALB/c mice treated with celecoxib (Fig 2, panel B, $P < 0.001$).

In addition, we analyzed the effect of COX inhibition on parasitism in heart tissue taken from C57BL/6 and BALB/c mice treated with NSAIDs at 12 days after infection with *T. cruzi*.

On day 12 p.i, the heart tissue from C57BL/6 mice treated with the celecoxib had three-fold more parasites nests than those of untreated mice (Fig. 3A, $P < 0.05$) and those treated with Asa had two-fold more parasites nests than untreated. (Fig. 3A, $P < 0.05$). We observed an increase tendency in the number of parasites nests in the heart from infected mice treated with Indo, but the increase was not significant (Fig.3A, $P > 0.05$). In the same infection period, BALB/c treated with celecoxib, Asa and Indo had five and nine-fold more parasites nests than those of untreated mice, respectively (Fig. 3B, $P < 0.05$).

3.2 Effects of COX-1 and COX-2 inhibition on anemia in *T. cruzi*-infected mice

We conducted blood cells counts and measured several haematological values in uninfected and *T. cruzi*-infected treated or not with NSAIDs at 12 days post-infection. Based on significant decreases in hemoglobin, hematocrit and erythrocyte numbers, all two mice strains studied suffered from anemia on 12th day post-infection (Table I). The severity of the

anemia was greatest for C57BL/6 mice. Interestingly, the inhibition of endogenous PGs production did not impact on the extent of anemia that developed 12 days post-infection in the two mice strains (Table I). *T. cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice was associated with a significant decrease in total number of bone marrow cells (Table I). COX-1 and COX-2 inhibition had no effect on bone marrow hypoplasia in both strains of *T. cruzi*-infected mice (Table I).

3.3 COX-2 inhibition with celecoxib treatment attenuates thrombocytopenia and leukopenia that develop in C57BL/6 infected with T. cruzi

Because anemia, thrombocytopenia and leukopenia are associated with *T. cruzi* infection, we asked these changes occur in *T. cruzi*-infected mice and treated with inhibitors of PGs generation. As shown in Figures 4 and 5, platelet and white cell counts revealed thrombocytopenia and leukopenia in both infected strains mice. Interestingly, only the treatment of C57BL/6 infected mice with celecoxib (selective COX-2 inhibitor) was able to attenuate the thrombocytopenia (Fig. 4A, $P < 0.05$ when compared with infected group) and leukopenia (Fig. 4B, $P < 0.05$) observed on 12th day of infection. None of the treatments with different NSAIDs had effect on the thrombocytopenia and leukopenia that occur in BALB/c mice infected with *T. cruzi* (Fig. 5A and Fig 5B, $P > 0.05$ when compared with infected group).

In addition, we noted a significant increase in reticulocytes present in both the C57BL/6 and BALB/c mice (Fig. 4 C and 5 C). Only the treatment of C57BL/6 mice with celecoxib increased the percentage of reticulocytes in *T. cruzi*-infected mice (day 12 p.i., Fig. 4 C, $P < 0.05$). Indomethacin but not celecoxib and Asa treatment of BALB/c mice significantly increased the reticulocytosis associated with *T. cruzi*-infection in this susceptible strain of mice (Fig. 5 C, $P < 0.05$).

3.4 Effects of *in vivo* COX inhibition on differential production of NO in macrophages from *T. cruzi*-infected mice

We determined the NO production in order to verify whether the *in vivo* treatment of infected C57BL/6 and BALB/c mice with NSAIDs could be alter the differential production of this compound by C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages during *T. cruzi* infection.

We observed that macrophages from BALB/c respond poorly to infection with *T. cruzi* for the spontaneous production of NO compared with macrophages from C57BL/6 (Fig 6A and Fig. 6B). In C57BL/6 mice on 12th day of infection, the Asa treatment provoked decreased in the NO production by M-1 macrophages while that celecoxib treatment increased the NO production by these cells (Fig 6A, $P < 0.05$). The indo treatment had not effect on NO production by M-1 (Fig 6A, $P > 0.05$), when compared with the production of NO by M-1 from infected and untreated mice. In parallel, we verified that all NSAIDs treatment used increased NO production in M-2 macrophages when compared with infected untreated mice (Fig. 6B, $P < 0.05$).

3.5 Erythrocyte oxidative stress

Oxygen uptake by erythrocytes is directly associated with the susceptibility of the erythrocyte membrane to undergo lipid peroxidation elicited by *t*-BHP and is proportional to previous oxidative stress experienced by the erythrocyte *in vivo*. The oxygen uptake by erythrocytes from C57BL/6 and BALB/c mice was significantly increased 12 days following infection (Fig. 7A and Fig 7B; $P < 0.05$). The treatment with NSAIDs used significantly diminished erythrocyte oxygen uptake in both strains infected mice (Fig. 7A and Fig 7B; $P < 0.05$)

Induction time (T^{ind}) is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity of the erythrocyte. *T. cruzi* infection in the C57BL/6 and BALB/c mice resulted in a significant reduction in T^{ind} (Fig. 8; $P < 0.05$). Treatment of C57BL/6 mice with NSAIDs completely abrogated the infection-associated decline in T^{ind} (Fig. 8A, $P < 0.05$). Prior to infection, T^{ind} was significantly longer in erythrocytes isolated from BALB/c mice compared to C57BL/6 mice. Only the treatment with celecoxib protected against the reduction of antioxidant capacity of BALB/c erythrocytes on day 12 post-infection (Fig.8B; $p < 0.05$).

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

The Figure 9 shown the time course of *tert* butyl hidroperoxide-initiated CL of mice from *T. cruzi* infection. The CL time course curves of erythrocytes from the C57BL/6 (Figure 9A) and BALB/c (Figure 9B) infected-mice (on day 12 after infection), showed a significant photon emission increase and shift of its maximum to the left. It means an increased lipid peroxides and reduced antioxidant defenses in the erythrocytes membrane from *T. cruzi* infected-mice (day 12 of infection). The NSAIDs treatment of C57BL/6 (Figures 9A) but not BALB/c mice (Figures 9B) was able to quench significantly the photon emission. These results indicate that PGs play a role in pre-hemolytic damage during experimental *T. cruzi* infection.

4. Discussion

C57BL/6 and BALB/c mice are prototype hosts for the study of resistance and susceptibility to several infectious diseases, including Chagas' disease [57]. In this study we

demonstrated that the experimental infection with *Trypanosoma cruzi* is characterized by exponential growth of parasites and oxidative stress associated with anemia in both resistant and susceptible strains of mice. In many cases, resistance of C57BL/6 is due to the microbicidal effect of nitric oxide (NO) produced by macrophages in response to interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), mainly secreted by Th1 cells and macrophages, respectively. BALB/c, usually unable to give rise to Th1 lymphocytes, does not control certain infection [57].

Although it has been shown that prostaglandins (PGs), together with NO and TNF- α participate in a complex circuit that controls lymphoproliferative and cytokine responses in *T. cruzi* infection [30], the possible involvement of cyclooxygenase-released prostaglandin in the oxidative stress associated with anemia in the early of *T. cruzi* infection had not hitherto been investigate. In addition, studies that utilized inhibitors of cyclooxygenase to determine the role of PGs in the control of parasitism and resistance to *T. cruzi* infection are discrepant [28-31].

We tested three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): aspirin, an inhibitor of both constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenases (COX); indomethacin a preferential antagonist of COX-1; and celecoxib, a COX-2 selective inhibitor [48]. We demonstrated that in the early of infection the treatment with Asa, indomethacin or celecoxib increased dramatically the parasitemia in the blood and declined the survival rate of *T. cruzi*-infected resistance C57BL/6 mice. The inhibition of COX-2 with celecoxib provoked the same in parasite-infected susceptible BALB/c mice. Although the blockade of COX-1 with Asa or with indomethacin has provoked a tendency of decrease of parasites in the blood from BALB/c, it was not capable to modify the survival rate of those mice.

In agreement with our results, Celentano and collaborators [28] observed that the treatment with cyclooxygenase inhibitors (aspirin or indomethacin) enhanced mortality rates

of C3H/HeN mice infected with *T. cruzi* (K98 strain). However, differently to ours results and those of Celentano and collaborators, others have found that the inhibition of the PGs synthesis abolish the parasitemia and delay the mortality of susceptible BALB/c *T. cruzi* infected-mice [29,31]. The answers to these questions are not easy to answer and the effects of NSAIDs on *T. cruzi* infection have been mysterious since the paper original of Celentano and collaborators [28].

Work in several laboratories has revealed that PGs is mainly produced by APCs (antigen-presenting cells) such as monocytes, macrophages, and dendritic cells, and the effects are almost suppressive on Th1-related immune responses, PGE₂ suppress IL-2 and IFN- γ production by Th1 clone, but no IL-4 and IL-5 production by Th2 clone [36,58]. The suppression of PGs by indomethacin prompted the development of a protective Th1 type response in BALB/c mice by a mechanism, which involves an enhancement of IL-12, IFN- γ and NO production [59].

In *T. cruzi* infection, BALB/c mice are susceptible and show higher IL-4 production and parasitemia than resistant C57BL/6 mice [60]. It is possible that the inhibition of PGs production accomplished in our studies do not induced alterations in the production of IL-4 in BALB/c infected with *T. cruzi*, but can might have inhibited the development of protective Th1 response in C57BL/6 mice. In fact, recent studies show that NSAIDs selectively inhibits interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α production by spleen cells [31], natural killer (NK) and $\gamma\delta$ T cells [61] with each NSAID displaying its own unique pattern of inhibition and these inhibitions were independent on cyclooxygenase inhibition. However, the high lethality after NSAIDs treatment could be related to a marked systemic increase of TNF- α production in a situation analogous to that observed for *T. cruzi*-infected C57BL/6 [30] and IL-10^{-/-} mice [62]. In addition, there is a strong difference in ability to produce PGE₂ by

BALB/c and C57BL/6 mice [63]. All these data together may explain the discrepant results found by us and other authors.

Our additional experiments revealed that on day 12 of infection, celecoxib and Asa but not indomethacin treatment increased parasites nests than those infected-untreated C57BL/6 mice. Interestingly, the heart tissue from infected BALB/c (day 12 p.i) and treated with the antagonist of COX-1 (indomethacin), had eight-fold more amastigotes nests than infected-untreated mice. The celecoxib or Asa increased the heart parasitism, but your action was smaller than mice infected-untreated.

So, our results suggest for the first time that cyclooxygenase-released prostaglandin plays a critical role in the heart protective immunity against *T. cruzi* in an experimental Chagas' disease model. More important, NSAIDs can be used clinically for fever control during *T. cruzi* infection. If we extrapolate our results to a clinical setting, treatment with NSAIDs may produce more severe disease and they serve as alert sign for those that defend the use of NSAIDs as potential drugs for therapy in the acute phase of Chagas's disease [29].

It is clear that intraperitoneal *T. cruzi* infection leads to an early activation of the COX [12,30,31] and NOS system [30,64], besides it was of interest to determine whether NSAIDs treatment could affect the spontaneous production of NO by macrophages from peritoneal cavity of *T. cruzi*-infected mice.

Confirming previous reports [64], we have observed that macrophages from BALB/c *T. cruzi* infected-mice respond poorly for the production of NO compared with cells from C57BL/6 infected-mice. The inhibition of NO production by Asa in macrophages from C57BL/6 on day 12 p.i, could explain the increased of parasitemia and death of these animals in the early of infection with *T. cruzi*. Interesting, the same treatment provoked an increased of NO production in BALB/c infected mice and this could explain the control of parasitemia

in the early of infection for BALB/c Asa-treated infected-mice. The treatment with Indo had not effect on NO production by macrophages from C57BL/6 and the treatment with celecoxib increased NO production by macrophages. The longer survival of C57BL/6 celecoxib treated infected-mice than Indo treated infected-mice can be explain for these differences in NO production. The little increase of NO production by macrophages from BALB/c infected and treated with celecoxib or Indo it was not enough to provoke a reduction in the parasitemia of those mice or to provoke increase in the survival rate.

In previous studies [25], we demonstrated that an acute infection of either C57BL/6 or Swiss mice with *T. cruzi* was generally associated with systemic oxidative stress evaluated by increased oxygen uptake and decreased induction time of erythrocytes. That aminoguanidine treatment of C57BL/6 mice hindered this oxidative lesion. That C57BL/6 iNOS^{-/-} showed high oxidative stress, suggested that \bullet NO and possibly reactive oxygen species (ROS), played a role in peroxidative lesion of erythrocytes membrane in this disease.

In the present study, we evaluated the effect of cyclooxygenases inhibitors on the oxidative stress in erythrocytes of mice sensitive (BALB/c) and resistant (C57BL/6) to infection for *T. cruzi*. For this purpose, tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (CL), a very sensitive and specific method, was employed to evaluate the integrity of non-enzymatic antioxidant defense mechanisms and quantify erythrocyte membrane lipid peroxide levels. The basis for this assay is the assumption that previous reactive oxygen and nitrogen species (i.e. ONOO⁻ and \bullet OH) attack generate membrane lipid peroxides and destroys the low molecular weight antioxidants in the tissue yielding a higher CL emission [54]. Our results reveals that the infection with *T. cruzi*, was associated with increased CL levels in erythrocytes of both C57BL/6 and BALB/c mice, nevertheless C57BL/6 mice erythrocytes had higher CL levels than BALB/c mice. This peroxidative lesion was confirmed by the increased oxygen uptake and decreased induction time in both strain mice. The data showed

here and our previous results together [25] indicated that acute infection of mice with *T. cruzi* leads to a oxidative damage to erythrocytes membrane and that $\bullet\text{NO}$ can partially be responsible for that process. Accordingly, in C57BL/6 mice, a good responder to iNOS induction gene, the nitrite levels in peritoneal macrophages arose about 5 times after 12 days of infection. Such increase was not seen in BALB/c mice namely, a poor responder to iNOS induction gene.

Oxidative stress in Chagas's disease has recently call attention as a possible pathogenetic mechanism. Erythrocytes GSH concentrations and GPx were reduced with the disease progression, suggesting systemic oxidative stress involvement in patients with Chagas cardiomyopathy [24,65]. Antioxidant such vitamin E and C administrated to these patients reverted the oxidative lesion [66]. Oxidative stress in heart but not in skeletal muscle of mice infected with *T. cruzi* evaluated by lipid peroxide and carbonylated proteins formation both in acute and cronic phases have been reported [21]. These authors propose a mitochondrial dysfunction as a causative of reactive oxygen species generation leading to progressive severity of chagasic cardiomyopathy. Extensive DNA damage in cardiac myocytes and in spleen cells have also been found in *T. cruzi* infection [67]. Free radicals-mediated $\bullet\text{NO}$ generation was suggested as a mechanism of DNA breakage for the authors. Decreased antioxidant defense has also been related in human and experimental studies in Chagas's disease [22].

In our experimental model, that emphasize systemic oxidative injury, besides of oxidative stress contribution that takes place in important organs such heart, liver, spleen [24,67], others mechanism such circulating neutrophils [68], macrophages cells [69, 8], arachidonic acid cascade [12], endothelial cells [70, 71] generating ROS and RNS can play a more significant role in erythrocytes pre-hemolytic lesion. In fact, our results revealed that

higher erythrocytes lipid peroxide levels observed in infected resistant C57BL/6 mice correlate with increased levels of $\bullet\text{NO}$ produced for peritoneal macrophages.

Increased of $\bullet\text{NO}$ production has been observed in J77.4 murine macrophages [72] and in spleen cells after *T. cruzi* infection [69]. In susceptible BALB/c mice, however, was not observed any increase in $\bullet\text{NO}$ after infection with *T. cruzi*. On contrary, ROS secreted by peritoneal macrophages during the chagasic infection of susceptible mice was higher than that observed in resistant one [73]. These data indicated that the C57BL/6 mice have high $\bullet\text{NO}$ levels while the BALB/c mice shows higher $\text{O}_2\bullet$ levels. Likewise the interpretation given to the comparison between C57BL/6 and Swiss mice [25], the erythrocytes oxidative injury found in this study might results of $\bullet\text{NO}$ reaction with $\text{O}_2\bullet$ yielding ONOO^- or by the Fenton reaction producing $\bullet\text{OH}$ near of outer leaflet of erythrocyte membrane both of which could lead to its oxidative lesion. In high $\bullet\text{NO}$ levels the reaction between $\bullet\text{NO}$ and $\text{O}_2\bullet$ is favoured because of rate constant of this reaction to be higher than that between $\text{O}_2\bullet$ and H_2O_2 [74]. This mechanism might be occurring in erythrocytes of C57BL/6 as suggested else were [25]. Moreover, since COX inhibitors efficiently inhibited the membrane lipid peroxide formation, the cyclooxygenase pathway may be involved in this process either increasing $\bullet\text{NO}$ generation or directly producing additional reactive oxygen species [75]. Unfortunately in our results only Asa was able to diminished significantly the $\bullet\text{NO}$ levels.

Involvement of cyclooxygenase-released prostaglandin in the oxidative stress induced by *T. cruzi* infection has not been investigated yet. All three cyclooxygenase inhibitors employed, reduced significantly the levels of CL, oxygen uptake and increased the induction time in C57BL/6 mice infected with *T. cruzi*. Such effect was not observed in BALB/c mice with exception to reduced oxygen uptake in celecoxib treatment. These results indicate that arachidonic acid metabolism via cyclooxygenase at last in part, play a significant role in

oxidative damage in erythrocytes of C57BL/6 mice infected with *T. cruzi*. The oxidative stress verified for the BALB/c strain contrarily, do not depend on cyclooxygenase pathways. This profile was not reproduced in macrophages yielded \bullet NO. Except for aspirin, the others drugs did not inhibit the \bullet NO increase in peritoneal macrophages of C57BL/6 infected., The \bullet NO levels in BALB/c on contrary, were significantly increased. This is in accord with the finds showing *in vivo*, inhibition of prostaglandin release by selective inhibition of COX-2 has only minimal effects on \bullet NO production [76,77].

It could be suggested that the mechanism of oxidative stress in *T. cruzi* infection is dependent on strain. In C57BL/6 mice with high \bullet NO generation, both \bullet NO and ROS appears to be involved in CL emission curve observed in this strain. This statement is supported for the fact that aminoguanidine, a selective inhibitor of iNOS, reverted the erythrocytes lipid peroxidation in C57BL/6 and that C57BL/6 iNOS^{-/-} mice revealed high erythrocytes membrane lipid peroxide in a similar experimental design (25). Additionally, the fact that inhibitor of cyclooxygenase pathway inhibited significantly the CL in erythrocytes of C57BL/6 mice infected means that arachidonic acid metabolism by the cyclooxygenase pathways might be involved in ROS generation. In BALB/c with low \bullet NO levels production, the oxidative injury of erythrocyte depends almost exclusively of reactive oxygen species such \bullet OH and singlet oxygen. Moreover, since our results showed that cyclooxygenases inhibitor were not able to reduce the oxidative stress, it can be suggested that in this strain the oxidative damage of erythrocytes do not depend on neither \bullet NO nor cyclooxygenase-released prostaglandin.

In conclusion, our results indicated that the *T. cruzi* infection induced pre-hemolytic lesion in erythrocytes membrane through oxidative stress. This injury can be partially support the anemia observed in this disease. The mechanism by which the oxidative stress occur,

depend on the strain. In susceptible mice with low $\bullet\text{NO}$ generation the oxidative injury happens almost exclusively in function of ROS production and do not depend of cyclooxygenase pathway activation. In resistant mice with high $\bullet\text{NO}$ yielding, the oxidative injury depend on $\bullet\text{NO}$ reaction with $\text{O}_2^{\bullet-}$ given ONOO^- .

Speculative remark: Higher oxidative lesion observed in erythrocytes of C57BL/6 mice was associated with anemia, lower parasitemia burden and higher survival when compared to BALB/c. The question to be answered is: In which extent the oxidative stress either brings benefits or damages to the host? It has been demonstrated that oxidative stress exerts two main actions. In high level, it can promote tissue damage [25,54,55]. In a moderate level it is involved in modulation of gene expression such proinflammatory cytokines through NF κ B expression [78,79]. iNOS expression likely through NF-kappaB activation by *T. cruzi* infection, has been demonstrated recently [72]. Recent studies have shown that low oxidative stress levels modulates T cell polarization toward a Th2 phenotype that are related with the resistance to parasitic infection [80].

Acknowledgements

We thank Dr. Albert Leyva for assistance with English language editing of this paper and Jesus Antonio Vargas from Pathophysiology Laboratory of Free Radicals (State University of Londrina) for excellent technical assistance. We are grateful to the graduated students Danielle Lima de Santis, Elisângela de Marge Ribeiro and Juneci Mara Soares dos Santos for the breeding pairs of C57BL/6 and BALB/c mice. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (478239/01-7) and FAEP/UEL.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

5. References

- [1] Teixeira, A.R.L., Nascimento, R.J. and Sturm, N.R. (2006) Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101, 463-491.
- [2] Russo, N. and Starobinas, N. (1991) Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Res. Immunol.* 142, 144-146.
- [3] Kuhn, R.E. (1994) Macrophages in experimental Chagas' disease. *Immunol. Ser.* 60, 495-502.
- [4] Hoft, D.F., Schnapp, A.R., Eickhoff, C.S. and Roodman, S.T. (2000) Involvement of CD₄⁺ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68, 197-204.
- [5] Meyer Zum Büschenfelde, C., Cramer, S., Trumfheller, C., Fleischer, B. and Frosch, S. (1997) *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression *in vivo*: correlation with interferon-gamma (IFN- γ) production. *Clin. Exp. Immunol.* 110, 378-385.
- [6] Akira, S. (2000) The role of IL-18 in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 59-63.
- [7] Munoz-Fernandez, M.A, Fernandez, M.A and Fresno, M. (1992) Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 22, 301-307.
- [8] Cardoni, R.L., Antúnez, M.I., Morales, C. and Nantes, I.R. (1997) 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.
- [9] Vespa, G.N.R., Cunha, F.Q. and Silva, J.S. (1994) Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. Immun.* 62, 5177-5182.

- [10] Tarleton, R.L. (1988) *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-12 production. 1. Evidence for the presence of IL-12 producing cells. *J. Immun.* 140, 2763-2768.
- [11] Truyens, C., Angelo Barros, A., Torrico, F., Van Damme, J., Heremans, H. and Carlier, Y. (1994) Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infect. Immun.* 62, 692-696.
- [12] Cardoni, R.L. and Antúnez, M.I. (2004) Circulation levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators Inflamm.* 13, 235-240.
- [13] Cardoso, J.E. and Brener, Z. (1980) Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 75, 97-104.
- [14] Repka, D., Rangel, H.A., Atta, A.M., Gavino, V.A. and Piedrabuena, A.E. (1985) Experimental Chagas's diseases in mice infected with one LD⁵⁰ of parasite. *Rev. Bras. Biol.* 45, 309-316.
- [15] Ikede, B. O., Lule, M. and Terry, R. J. (1977) Anemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *Trypanosoma congolense* or *T. brucei*. *Acta Trop.* 34, 53-60.
- [16] Claster, S. (2002) Biology of anemia, differential diagnosis, and treatment options in human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 85, 105-109.
- [17] Weatherall, D.J., Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., Casals-Pascual, C. and Roberts, D.J. (2002) Malaria and red cell. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 35-57.
- [18] Paul, R.E.L. and Brey, P.T (2003) Malaria Parasites and red blood cells: from anemia to transmission *Mol Cells* 15, 139-149.
- [19] Clark, I.A., Budd, A.C., Alleva, L.M. and Cowden, WB. (2006) Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* 2006; 5: 85.

- [20] Marcondes, M.C., Borelli, P., Yoshida, N. and Russo, M. (2000) Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect.* 4, 347-352.
- [21] Wen, J.J., Vyatkina, G. and Garg, N. (2004) Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1821-1823.
- [22] Zacks, M.A., Wen J.J., Vyatkina, G., Bhatia, V. and Garg, N. (2005) An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad. Bras. Cienc.* 77, 695-715.
- [23] Wen, J.J., Yachelini, P.C., Sembaj, A., Manzur, R.E. and Garg, N. (2006) Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 270-276.
- [24] de Oliveira, T.B., Pedrosa, R.C. and Filho, D.W. (2006) Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *Int. J. Cardiol* (in press). doi:10.1016/j. Int J Card 2006, 04.046
- [25] Malvezi, A.D., Cecchini, R., Souza, F., Tadokoro, C.E., Rizzo, L.V. and Pinge-Filho, P. (2004) Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 41, 69-77.
- [26] Tribulatti, M.V., Mucci, J., Van Rooijen, N., Leguizamón, M.S. and Campetella, O. (2005) The trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia during Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic Acid Contents. *Infec. Immun.* 73, 201-207.
- [27] Santiago, H.C., Feng, C.G., Bafica, A., Roffe, E., Arantes, R.M., Cheever, A., Taylor, G., Vierira, L.Q., Aliberti, J., Gazzinelli, R.T. and Sher, A. (2005) Mice deficient in LRG-

- 47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J. Immunol.*, 8165-8172.
- [28] Celentano, A.M., Gorelik, G., Solana, M.E., Sterin-Borda, L., Borda, E. and González Cappa, S.M. (1995) PGE₂ involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins* 49, 141-153.
- [29] Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B.P., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Mello, F.G., Dos Reis, G.A. and Lopes, M. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199-203.
- [30] Pinge-Filho, P., Tadokoro, C.E. and Abrahamsohn, I.A. (1999) Prostaglandins-mediated suppression of lymphoproliferation and cytokine synthesis during the early phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.* 193, 90-98.
- [31] Michelin, M.A., Silva, J.S. and Cunha, F.Q.C.(2005) Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 111, 71-79.
- [32] Park, J.Y., Pillinger, M.H. and Abramson, S.B. (2006) Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clin Immunol.*, 119, 229-240.
- [33] Harris, A.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R.P. (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144-150.
- [34] Cillari, E., Liew, F.Y. and Lechuk, R. (1986) Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 54, 386-394.
- [35] Walker, C., Kristensen, F., Bettens, F. and de Weck, Al. (1983) Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E₂-induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.* 130, 1770-1773.

- [36] Katamura, K., Shintaku, N., Yoriko, Y., Fukui, T., Oshima, Y., Mayumi, M. and Furusho, K. (1995) Prostaglandin E₂ priming of naive CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN- γ and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J. Immunol.* 155, 4604-4612.
- [37] Argenzio, R.A. and Rhoads, J.M. (1997) Reactive oxygen metabolites in piglet cryptosporidiosis. *Ped. Research* 41, 521-526.
- [38] Yong, C.E., Chi, E.Y. and Henderson Jr., W.R. (1994) *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. *J. Exp. Med.* 180, 1637-1648.
- [39] Reiner, N.E. and Malesud, C.J. (1985) Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J. Immunol.* 134, 556-563.
- [40] Ulich, T.R., Dakay, E.B., Williams, J.H. and Ni, R.X. (1986) In vivo induction of neutrophilia, lymphopenia, and diminution of neutrophil adhesion by stable analogs of prostaglandins E1, E2, and F2 alpha. *Am. J. Pathol.* 124, 53-58.
- [41] Balazy, M. and Poff, C.D. (2004) Biological nitration of arachidonic acid. *Curr Vasc. Pharmacol.* 2, 81-93.
- [42] Silva, L.H.P. and Nussenweig, V. (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clin. Biol.* 20, 191-207.
- [43] Brener, Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 4, 389-396.
- [44] Narko, K., Zweifel, B., Trifan, O., Ristimaki, A., Lane, T.F. and Hla, T. (2005) COX-2 inhibitors and genetic background reduce mammary tumorigenesis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 76, 86-94.

- [45] Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (1994) Basic hematological techniques. In: Practical Haematology, Eighth Edition (Dacie J.V. and Lewis S.M Eds.) Edinburg: Churchill Livingstone.
- [46] Bain, B.J. (1997) Células Sanguíneas: Um guia prático, 2º Ed., pp 25-51. Porto Alegre, Artes Médicas Sul LTDA.
- [47] Tadokoro, C.E and Abrahamsohn, I. A. (2001) Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens Immunol Lett. 77, 31-38.
- [48] Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J. and Vane, J.R. (1994) Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11693-11697.
- [49] Matsuda, K., Nakamura, S. and Matsushita, T. (2006) Celecoxib inhibits nitric oxide production in chondrocytes of ligament-damaged osteoarthritic rat joints. 26, 991-995. Rheumatol. 26, 991-995
- [50] Stuehr, D.J. and Nathan, C.F. (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J. Exp. Med. 169, 1543-55.
- [51] Lissi, E.R., Frans, J.C., Fernandes, V. and Videla, L.A. (1986) Effects of antioxidants and haemoglobin status on the *t*-butyl hydroperoxide-induced oxygen uptake by red blood cells. Cell Biochem. Funct. 4, 447-454.
- [52] Bairy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C. (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquatic Toxicology: 34, 151-162.

- [53] Simão, A.N.C., Suzukawa, A.A., Casado, M.F., Oliveira, R.D., Guarnier, F.A. and Cecchini, R. (2006) Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2' –azobis (Amidinopropane). *Life Sci.* 78, 1202-1210.
- [54] Casado, M.F., Cecchini, A.L., Simão, A.N.C., Oliveira, R.D. and Cecchin, R. (2007) Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. *Food Chem. Toxicol.* (in press) Dóí: 10.1016/j.
- [55] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- [56] Miller, G.L. (1959) Protein determination of larger number of samples. *An. Chem:* 31, 964.
- [57] Roggero, E., Perez, A., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., Serra, E., Revelli, S. and Bottasso, O. (2002) 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.
- [58] Betz, M. and Fox, S. B. (1991) Prostaglandins E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146, 108-113.
- [59] Pérez-Santos, J.L.M., Talamás-Rohana, P. (2001) *In vitro* indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite immunol.* 23, 599-606.
- [60] Hoft, D.F., Lynch, R.G. and Kirchhoff, L.V. (1993) Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 151, 7038-7047.

- [61] Inaoka, M., Kimishima, M., Takahashi, R. and Shiohara, T. (2006) Non-steroidal anti-inflammatory drugs selectively inhibit cytokine production by NK cells and gamma delta T cells. *Exp. Dermatol.* 15, 981-990.
- [62] Hunter, C.A., Ellis-Neyes, L.A., Slifer, T., Kanaly, S., Grünig, G., Fort, M., Rennick, D. and Araujo, F.G., (1997) IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 158, 3311.
- [63] Kuroda, E. and Yamashita, U. (2003) Mechanisms of enhanced macrophage-mediated Prostaglandin E₂ production and its suppressive role in Th₁ activation in Th₂-dominant BALB/c mice. *J. Immunol.* 170, 757-764.
- [64] Santos, J.L., Andrade, A.A., Dias, A.A.M., Bonjardim, C.A., Teixeira, S.M.R., Reis, L.F.L. and Horta, M.F. (2006) Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages in IFN- γ /LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. *J. Interf. Cytocine Research*, 67-73.
- [65] Pérez-Fuentes, R., Guégan, J-F., Barnabé, C., López-Colombo, A., Salgado-Rosas, H., Torres-Rasgado, E., Briones, B., Romero-Díaz, M., Ramos-Jiménez, J. and Sanches-Guillén, M.C. (2003) Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *J. Parasitol.* 33, 293-299.
- [66] Maçao, L.B., Filho, D.W., Pedrosa, R.C., Pereira, A., Backes, P., Torres, A.A. and Fröde, T.S. (2006) Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. (In press) doi:10.1016/j.Int JCard2006.11.118.
- [67] Ribeiro, D.A., Calvi, S.A., Picka, M.M., Persi, E., Carvalho, T.B., Caetano, P.K., Nagoshi, L.R., Lima, C.R.G., Machado, J.M. and Salvadori, D.M.F. (2007) DNA damage and nitric oxidative synthesis in experimentally infected balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* (In press) doi: 101016/jexppara.2006.12.007.

- [68] Docampo, R., Casellas, A.M., Madeira, E.D., Cardoni, R.L., Moreno, S.N.J. and Mason, R.P. (1983) Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi*-stimulated human neutrophils. *Febs Letters* 155, 25-30.
- [69] Cardoni, R.L., Rottenberg, M.E. and Segura, E.L. (1990) Increase production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Immunol.* 128, 11-21.
- [70] Pinto, N.X., Torres-Hillera, M.A., Mendoza, E. and Leon-Sarmiento, F.E. (2002) Immune response, nitric oxide, autonomic dysfunction and stroke: a puzzling linkage on *Trypanosoma cruzi* infection. *Med. Hypotheses* 58, 374-377.
- [71] Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Esposito, E., Macarthur, H., Matuschak, G.M. and Salvemini, D. (2006) A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 73-81.
- [72] Bergeron, M. and Olivier, M. (2006) *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J. Immunol.* 177, 6271-6280.
- [73] Russo, M., Starobinas, N., Ribeiro-Dos-Santos, R., Minoprio Eisen, P.H. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1989) Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 11, 385-395.
- [74] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1999) *Free radical in biology and medicine.* Oxford University Press, Oxford. p, 54-60, 94.
- [75] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1999) *Free radical in biology and medicine.* Oxford University Press, Oxford. p, 307.
- [76] Salvemini, D. (1997) Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell. Mol. Life sci.* 53, 576-582.

- [77] Hamilton, L.C. and Warner, T.D. (1998) Interactions between inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase *in vivo*: investigations using the selective inhibitors, 1400W and Celecoxib. *British J. Pharmacol.* 125, 335-340.
- [78] Müller, J.M., Rupec, R.A., and Baeuerle, P.A. (1997) Study of gene regulation by NF- κ B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 11, 301-312.
- [79] Li, Q. and Engelhardt, J.F. Interleukin-1 β induction of NF- κ B is partially regulated by H₂O₂-mediated action of NF- κ B-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 281, 1495-1505.
- [80] King, M.R., Ismail, A.S., Davis, L.S. and Karp, D.R. (2006) Oxidative stress promotes polarization of human Tcell differentiation toward a T helper 2 phenotype. *J. Immunol.* 176, 2765-2772.

Table I. Hematological values and bone marrow cells counts[∇] in *T. cruzi*-infected mice**.

Group	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	Erythrocytes (x10 ⁹ /mL)	Bone Marrow cells (x 10 ³ /mL)
C57BL/6				
N	14.4 ± 0.4	45.0 ± 0.6	7.1 ± 0.3	5200 ± 1110
I	10.2 ± 1.0*	29.8 ± 2.2*	5.6 ± 0.7*	3560 ± 1370*
I + Celecoxib	10.5 ± 2.0	34.0 ± 5.0	6.1 ± 0.3	3240 ± 1170
I + Asa	10.3 ± 1.0	32.8 ± 1.6	5.9 ± 0.2	2790 ± 790
I + Indo	10.3 ± 1.0	32.7 ± 3.2	5.8 ± 0.4	2630 ± 730
BALB/c				
N	14.5 ± 1.4	44.6 ± 2.2	8.0 ± 0.1	4720 ± 830
I	12.0 ± 1.5*	35.6 ± 2.0*	5.5 ± 0.2*	2660 ± 1370*
I + Celecoxib	11.1 ± 0.5	34.7 ± 1.5	6.6 ± 0.1*	2150 ± 660
I + Asa	10.0 ± 1.1	31.8 ± 2.9	5.3 ± 0.3	2740 ± 890
I + Indo	10.2 ± 1.6	33.4 ± 4.0	6.1 ± 0.4	2060 ± 210

[∇] Day 12 after *T. cruzi* infection. ** Groups of mice were infected (I) with 5x10³ *T. cruzi* or infected and treated with celecoxib, Asa or Indo. Normal mice (N). Values represent the mean ± SD and are representative of two independent experiments, using 5 to 12 mice per group * Significantly different (p<0.05) when compared with non-infected group.

Figure Legends

Fig. 1. A) Parasitemia and B) survival rates. Groups of ten C57BL/6 mice were infected with 5×10^3 trypomastigote of *T. cruzi* (Y stain) and treated with indomethacin (Indo) (1.2 mg/kg^{-1}), aspirin (Asa) (50 mg/Kg^{-1}) and celecoxib (50 mg/Kg^{-1}). Mice received the first dose 4 h after infection and were treated until they died. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's test. * $P < 0.05$ was considered significantly.

Fig. 2. A) Parasitemia and B) survival rates. Groups of ten BALB/c mice were infected with 5×10^3 trypomastigote of *T. cruzi* (Y stain) and treated with indomethacin (Indo) (1.2 mg/kg^{-1}), aspirin (Asa) (50 mg/Kg^{-1}) and celecoxib (50 mg/Kg^{-1}). Mice received the first dose 4 h after infection and were treated until they died. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's test. * $P < 0.05$ was considered significantly.

Fig. 3. Quantification of amastigotes nests from heart of C57BL/6 (A) and BALB/c (B), mice on day 12-pos infection. Groups of C57BL/6 mice were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain) and treated with indomethacin (Indo) (1.2 mg/kg^{-1}), Aspirin (Asa) (50 mg/Kg^{-1}) and celecoxib (50 mg/Kg^{-1}) during 12 days. Mice received the first dose 4 h after infection. Untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. The number of amastigotes nests was counted in an area of 10 mm^2 per section. Three sections were counted for each animal and the result is expressed as the mean \pm standard deviation of this three sections. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's test. Means not sharing a letter differ with $P < 0.05$.

Fig. 4 Platelet (A), leukocytes (B) and reticulocytes (C) were counts from peripheral blood from normal and infected mice. Groups of C57BL/6 mice were infected with 5×10^3 blood trypomastigote *T. cruzi* (Y strain) and were treated with indomethacin (Indo) (1.2 mg/kg^{-1}), aspirin (Asa) (50 mg/Kg^{-1}) and celecoxib (50 mg/Kg^{-1}) during 12 days. Mice received the first dose 4 h after infection. Normal mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's test.

Fig. 5 Platelet (A), leukocytes (B) and reticulocytes (C) were counts from peripheral blood from normal and infected mice. Groups of BALB/c mice were infected with 5×10^3 blood trypomastigote *T. cruzi* (Y strain) and treated or not with indomethacin (Indo) (1.2 mg/kg^{-1}), aspirin (Asa) (50 mg/Kg^{-1}) and celecoxib (50 mg/Kg^{-1}) during 12 days. Mice received the first dose 4 h after infection. Normal mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's test.

Fig. 6 NO_2^- accumulation in cultures of macrophages from *T. cruzi* infected-mice (day 12 after infection). Macrophage monolayers (2×10^5 cells/ $200 \mu\text{L}$) from C57BL/6 (A) and BALB/c (B), mice were incubated at 37°C in 5% CO_2 in the presence or absence of indomethacin (Indo) (1.2 mg/kg^{-1}), aspirin (Asa) (50 mg/Kg^{-1}) or celecoxib (C) (50 mg/Kg^{-1}) during 12 days. After 24 h the spontaneous accumulated NO_2^- was determined in the supernatant by the Griess reaction (see Material and Methods). Results are expressed as the mean \pm standard deviation from 10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Means not sharing a letter differ with $P < 0.05$.

Fig. 7 Erythrocyte oxidative stress on day 12 after *T. cruzi* infection. Here we measured oxygen uptake induced by *tert*-butyl hydroperoxide in erythrocyte from C57BL/6 (A) and BALB/c (B) mice. Animals were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, mice received aspirin (Asa, 50 mg/kg^{-1}), indomethacin (Indo, 1.2 mg/kg^{-1}) or celecoxib (50 mg/kg^{-1}) by the i.p route. Normal mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results are expressed as the mean \pm standard deviation from 5-10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Controls received saline injections only. Values represent the mean \pm standard deviation and are representative of five independent experiments, using 5 mice per group. Differences in oxygen uptake were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Means not sharing a letter differ, $*P < 0.05$.

Fig. 8 Erythrocyte antioxidant capacity on day 12 after *T. cruzi* infection. Here we measured induction time induced by *tert*-butyl hydroperoxide in erythrocyte from C57BL/6 (A), and BALB/c (B) mice. Animals were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, mice received aspirin (Asa, 50 mg/kg^{-1}), indomethacin (Indo, 1.2 mg/kg^{-1}) or celecoxib (50 mg/kg^{-1}) by the i.p route. Normal mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Results are expressed as the mean \pm standard deviation from 5-10 animals per group, and are representative of three independent experiments. Controls received saline injections only. Values represent the mean \pm standard deviation and are representative of five independent experiments, using 5 mice per group. Differences in induction time levels were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Means not sharing a letter differ, $*P < 0.05$.

Fig. 9 Time course curve of *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) in erythrocytes from C57BL/6 (A) and BALB/c (B) mice. Animals were infected with 5×10^3 trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Four hours after the infection, mice received aspirin (Asa, 50 mg/kg^{-1}), indomethacin (Indo, 1.2 mg/kg^{-1}) or celecoxib (50 mg/kg^{-1}) by the i.p route. Normal mice and untreated *T. cruzi*-infected mice were used as controls. Data from the curves were compared by Turkey-Kramer multiple comparison procedure and Student's *t*-test.

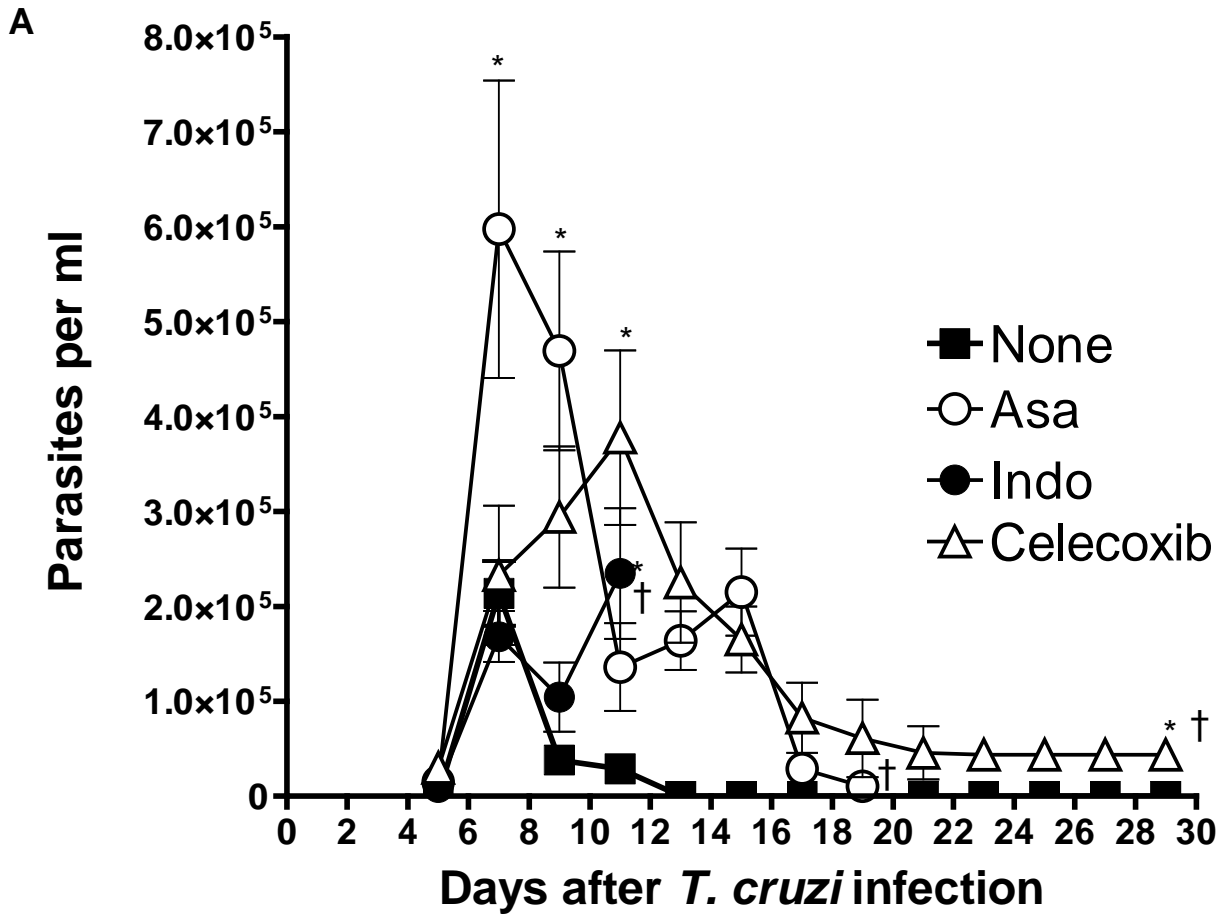


Figure 1A

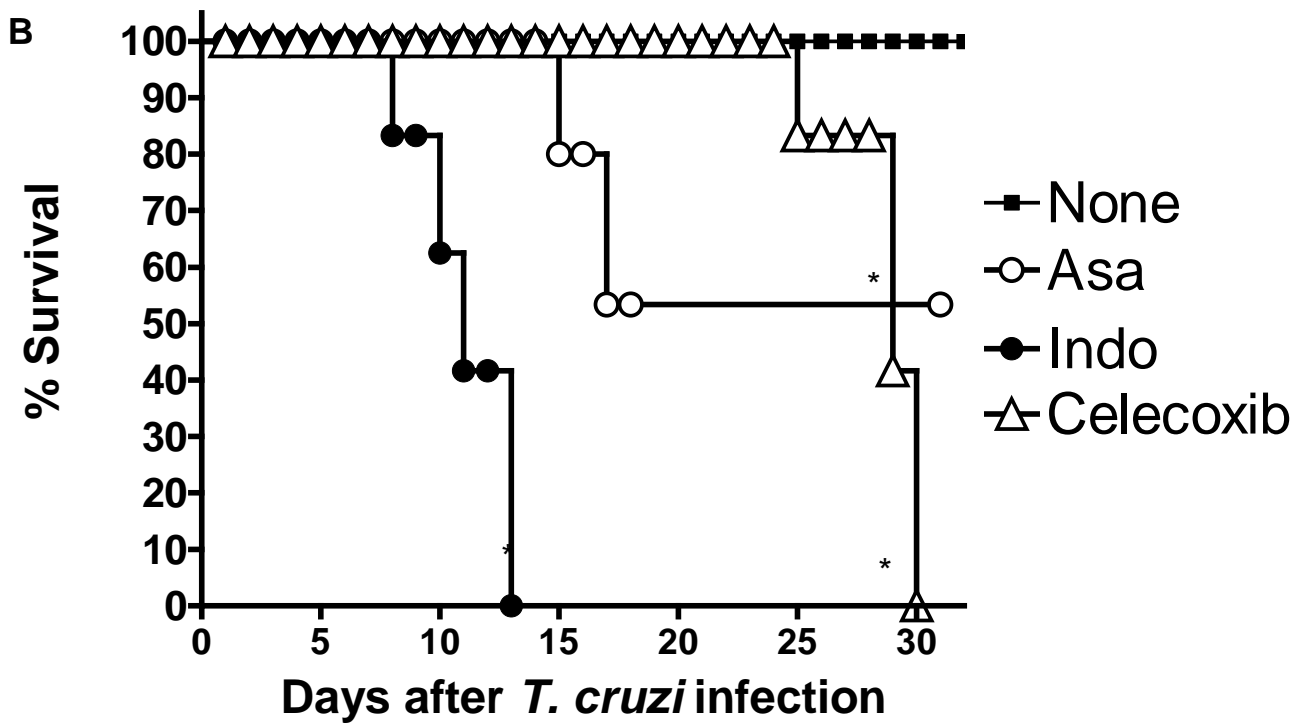


Figure 1B

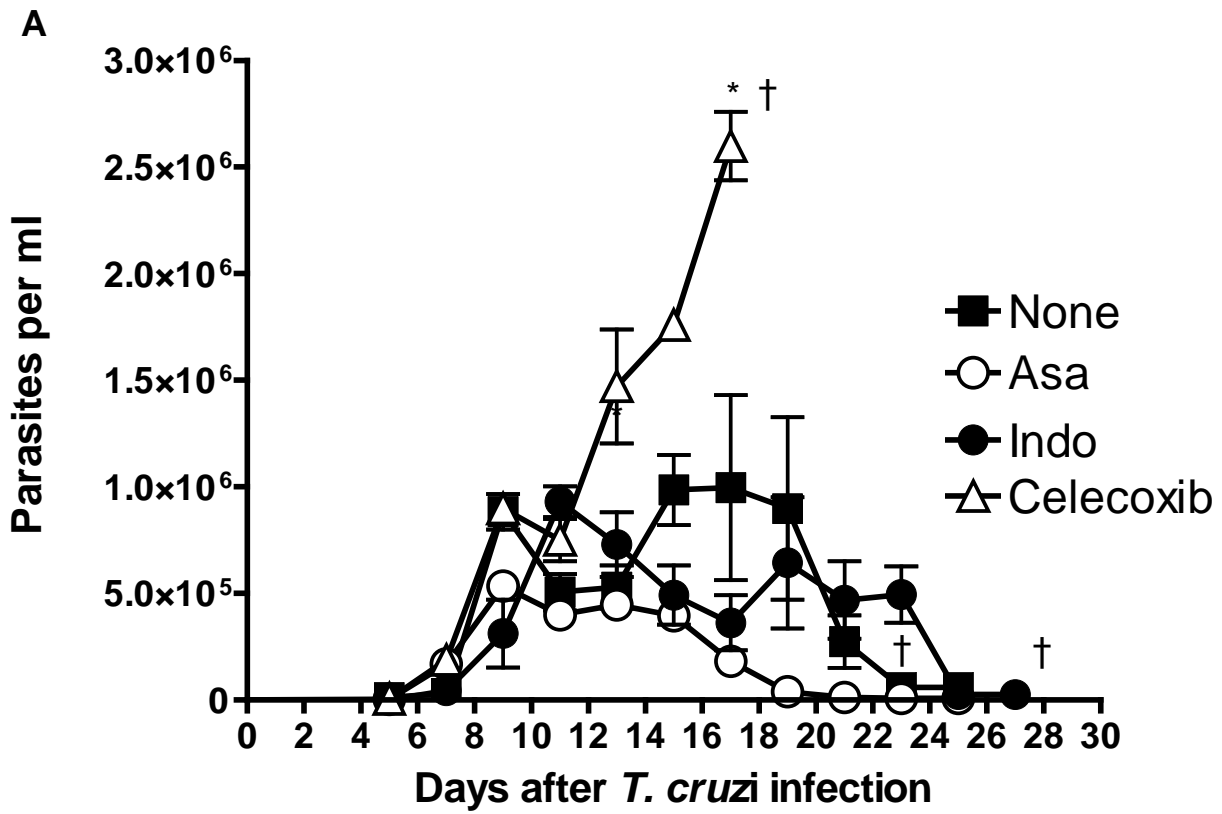


Figure 2A

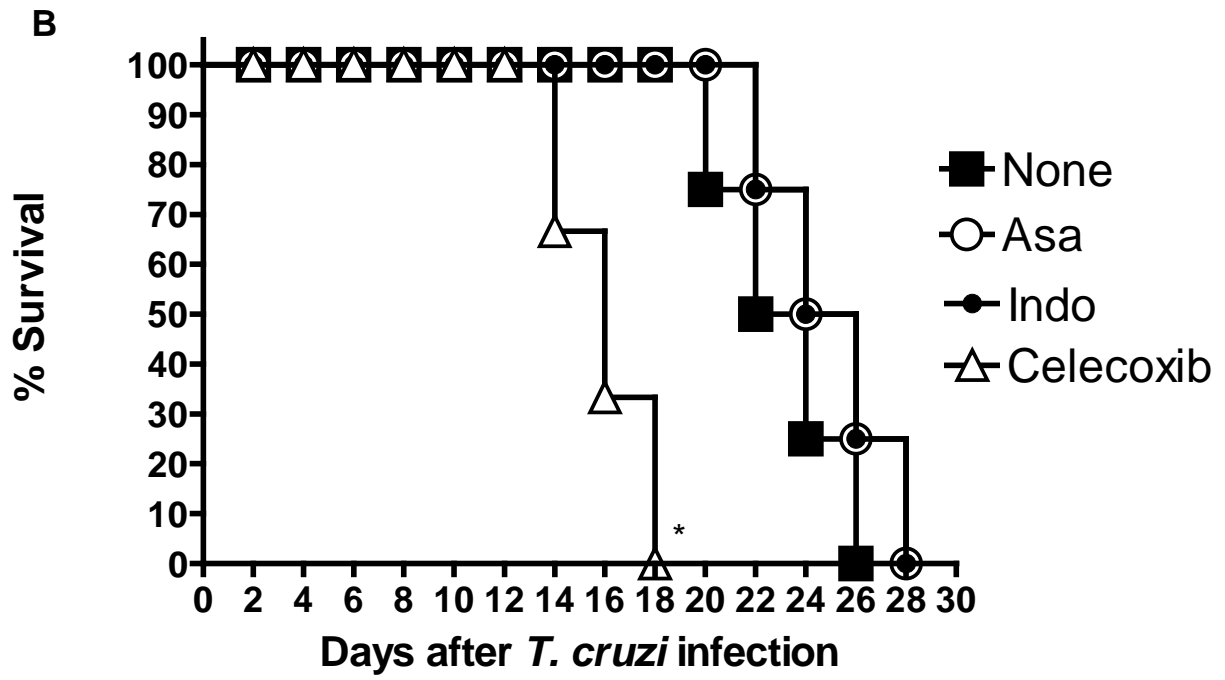


Figure 2B

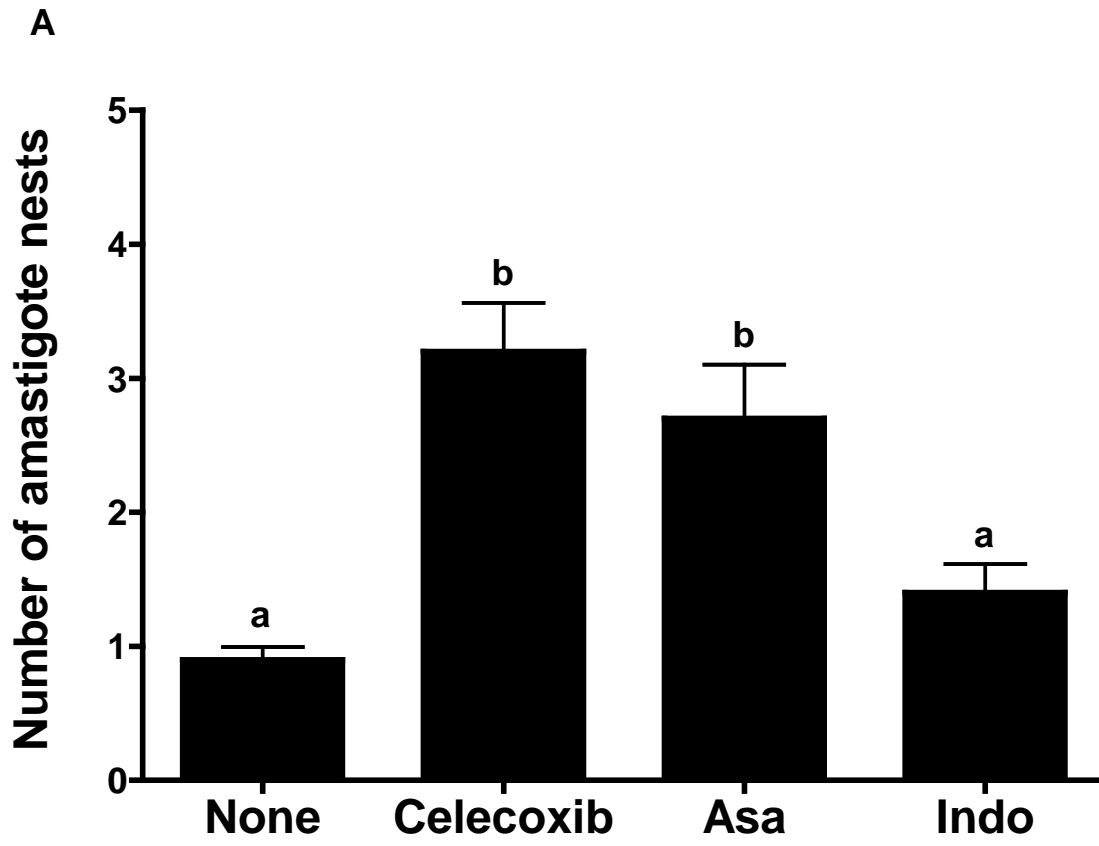


Figure 3A

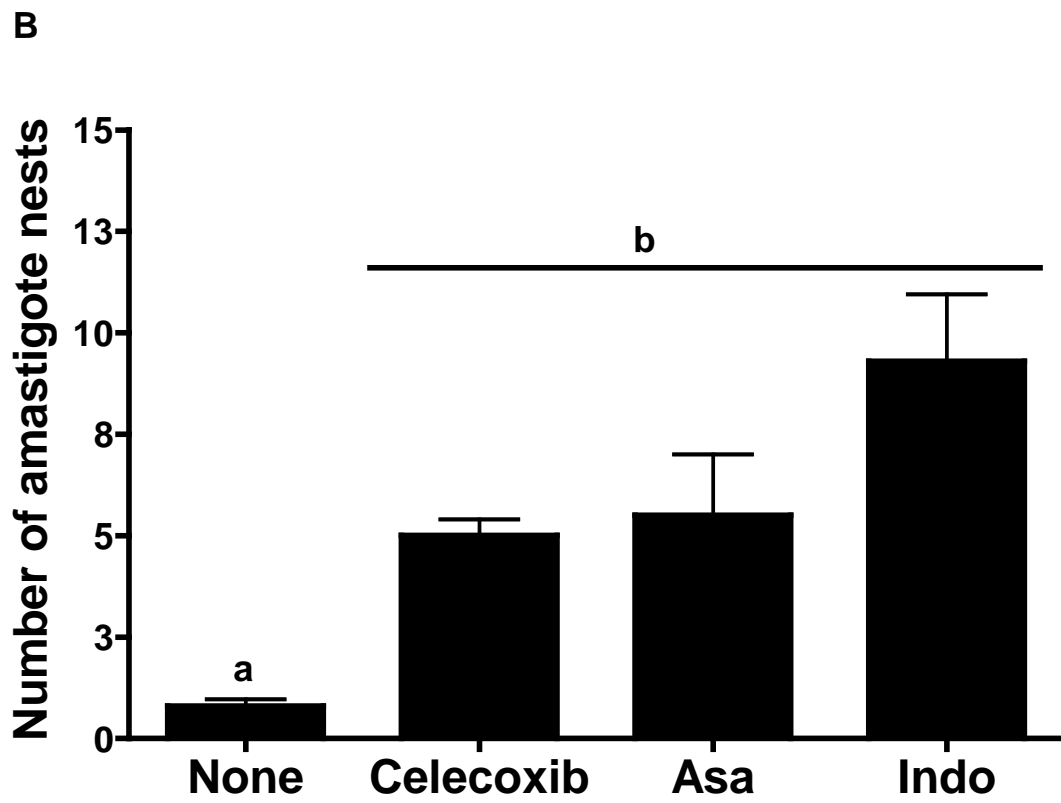


Figure 3B

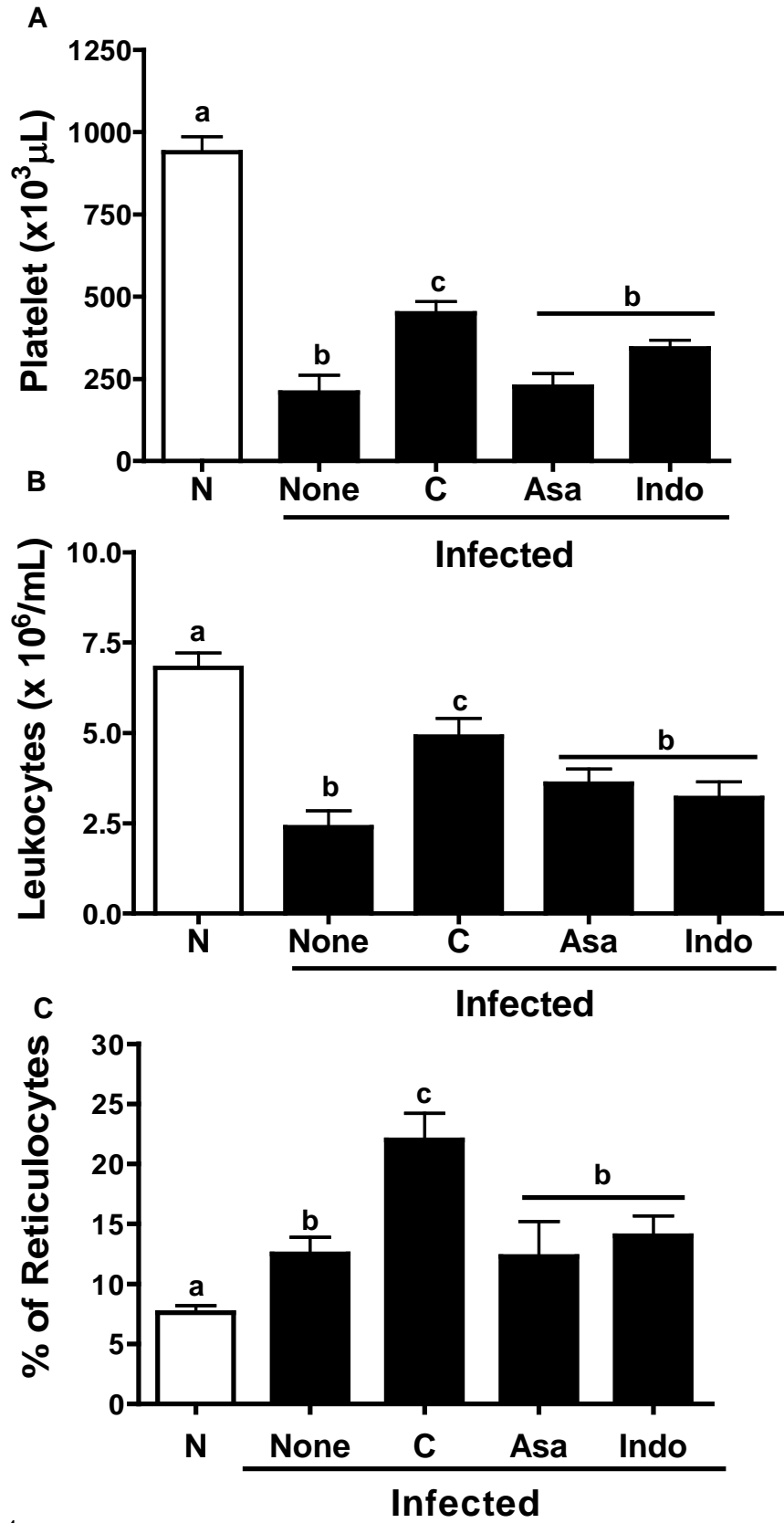


Figure 4

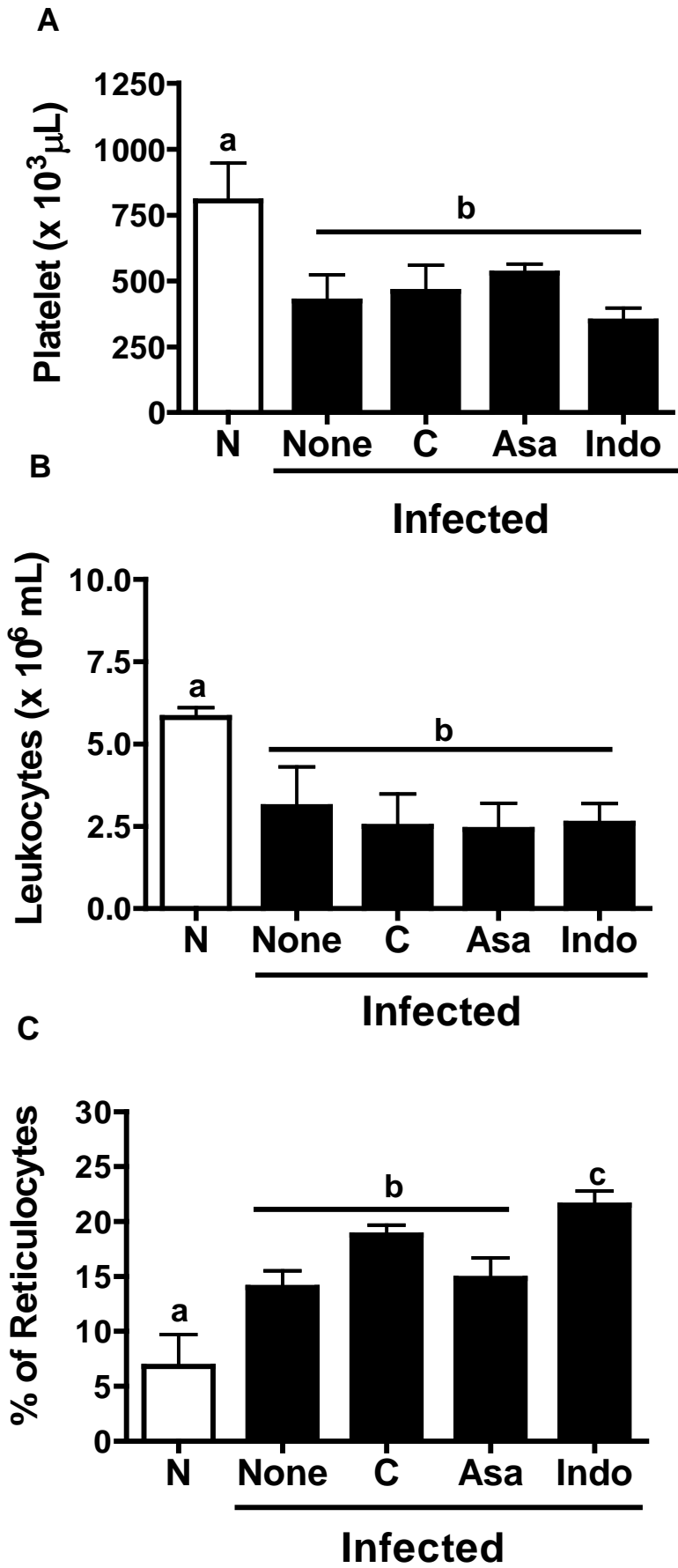


Figure 5

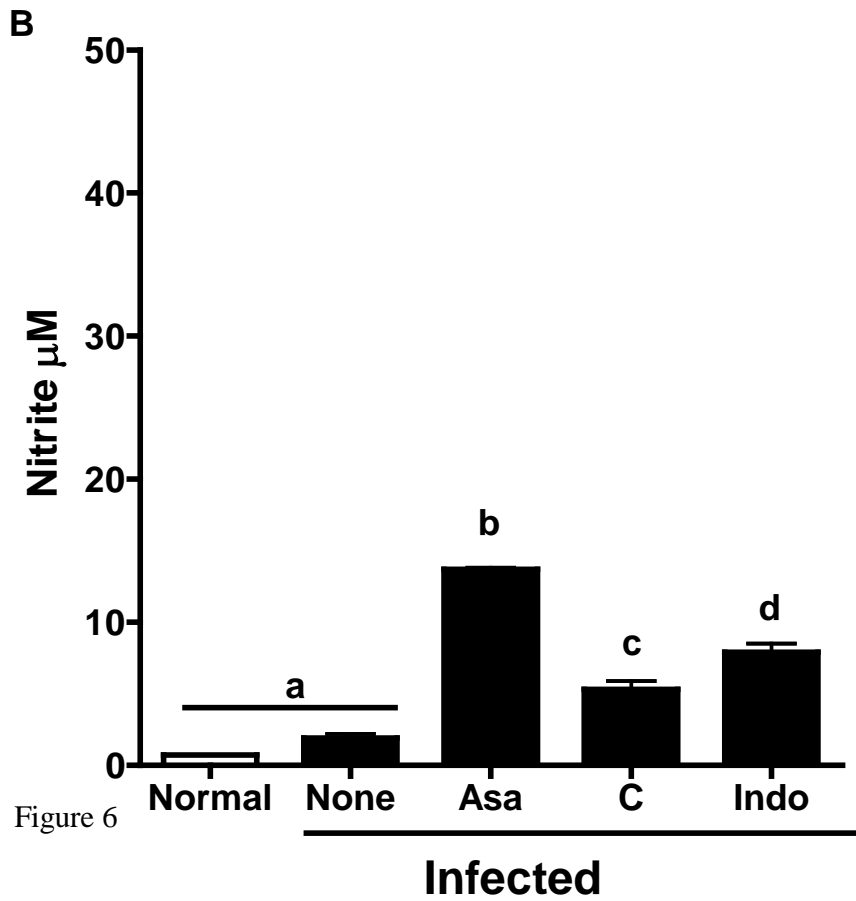
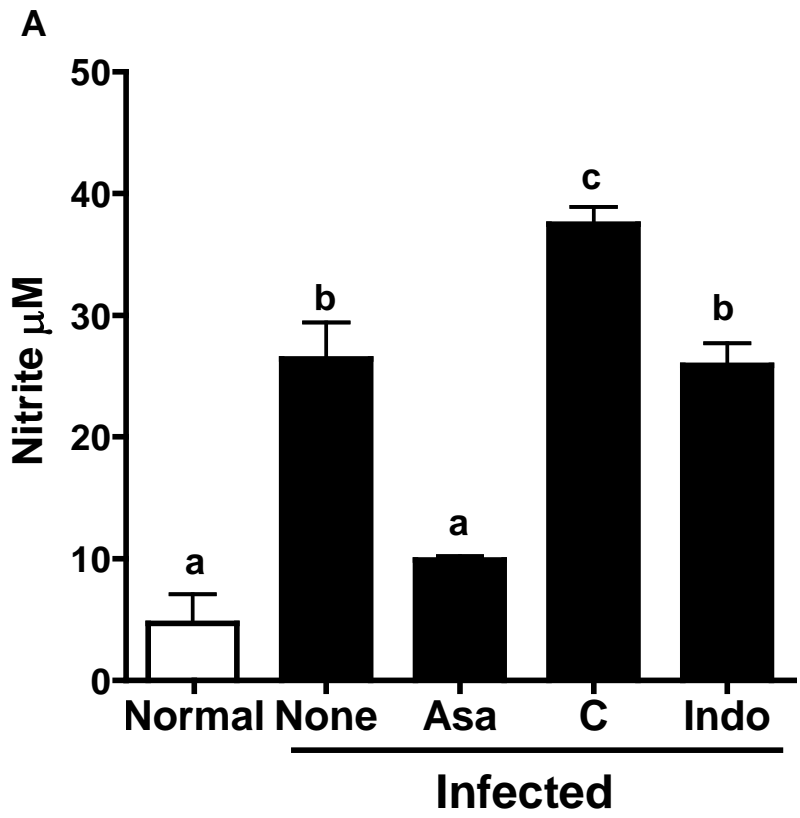


Figure 6

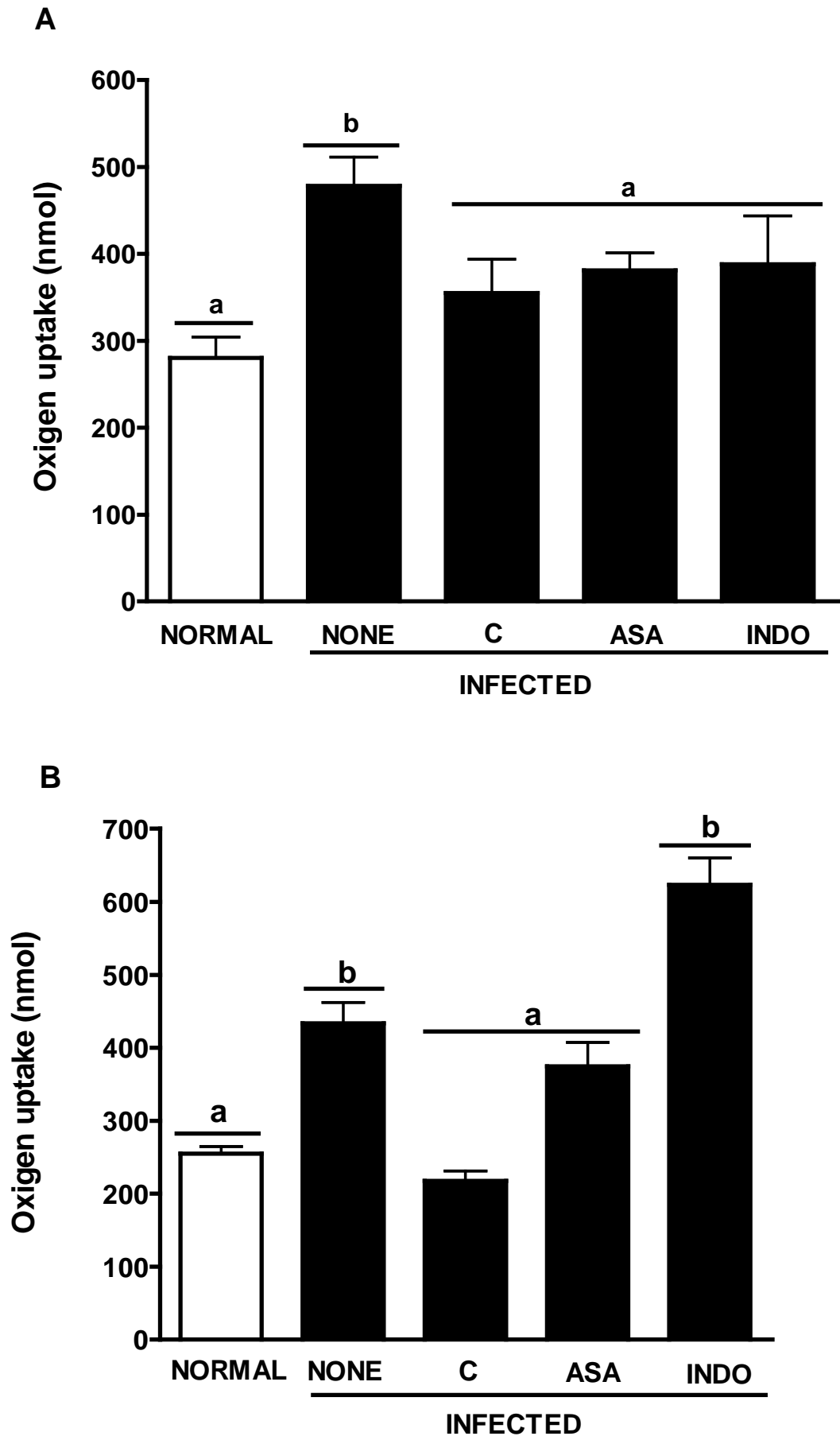


Figure 7

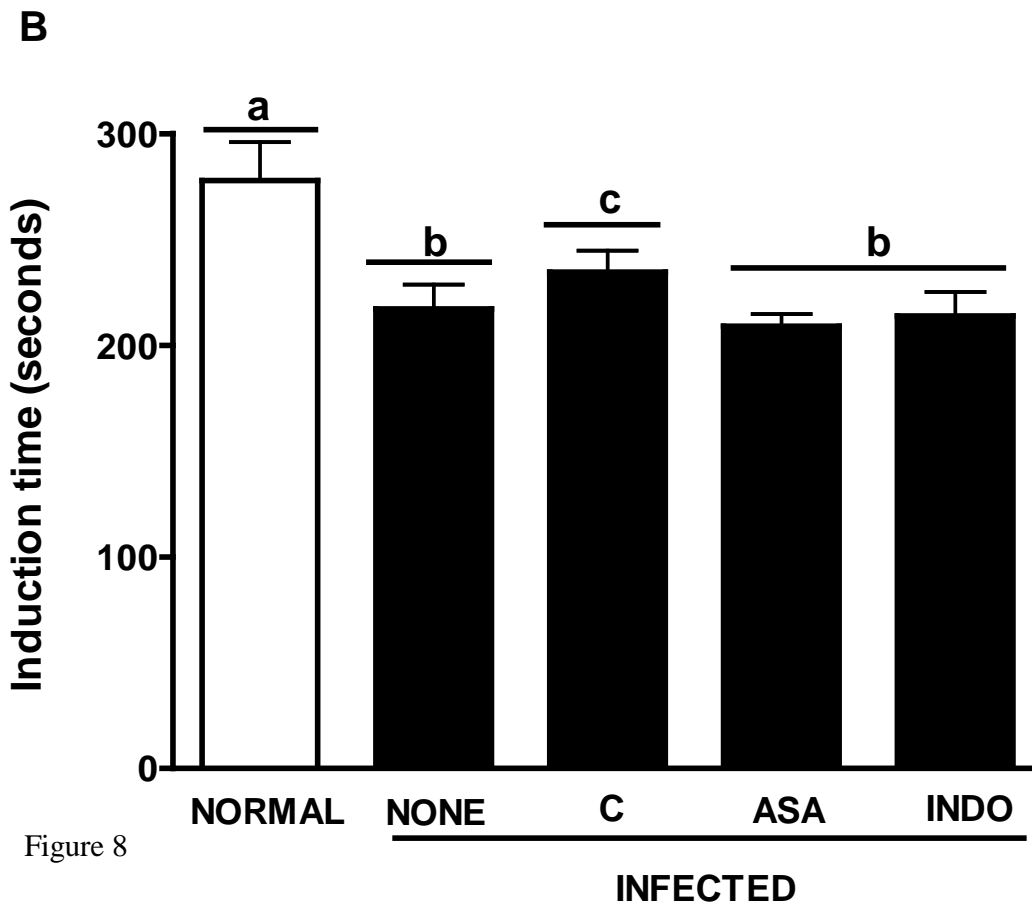
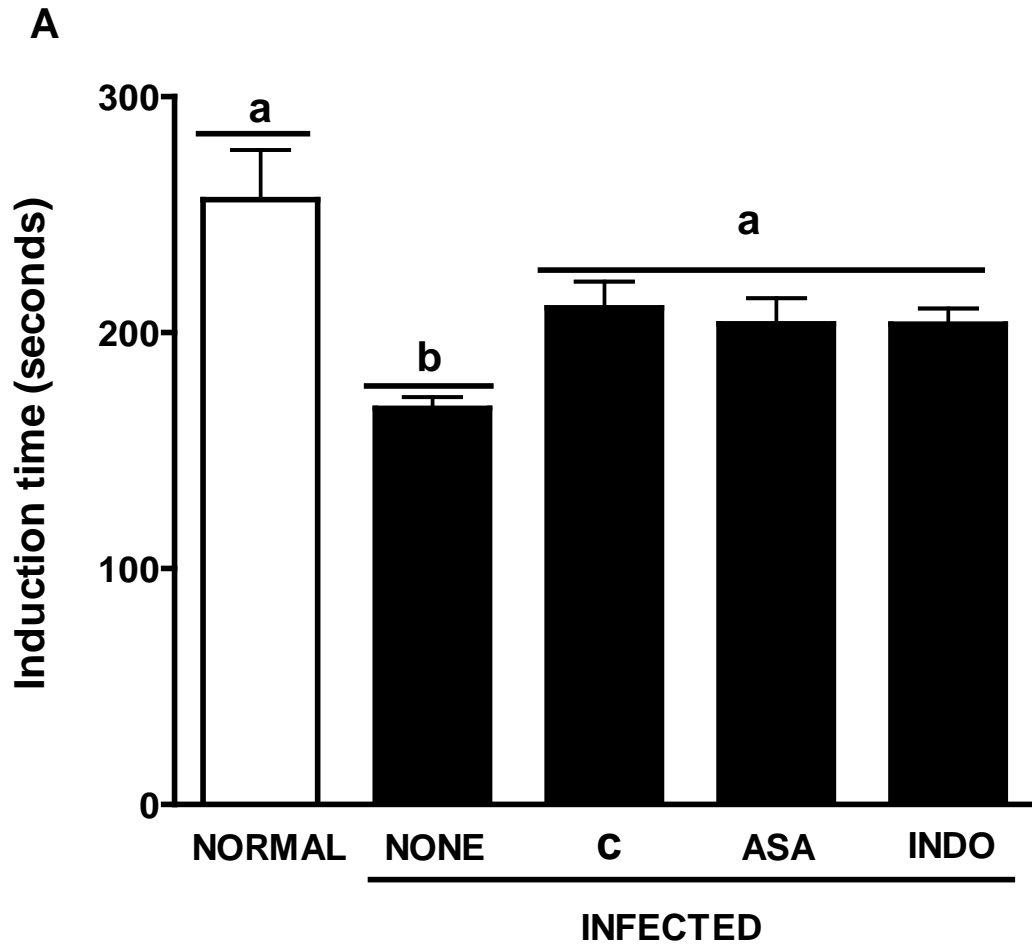


Figure 8

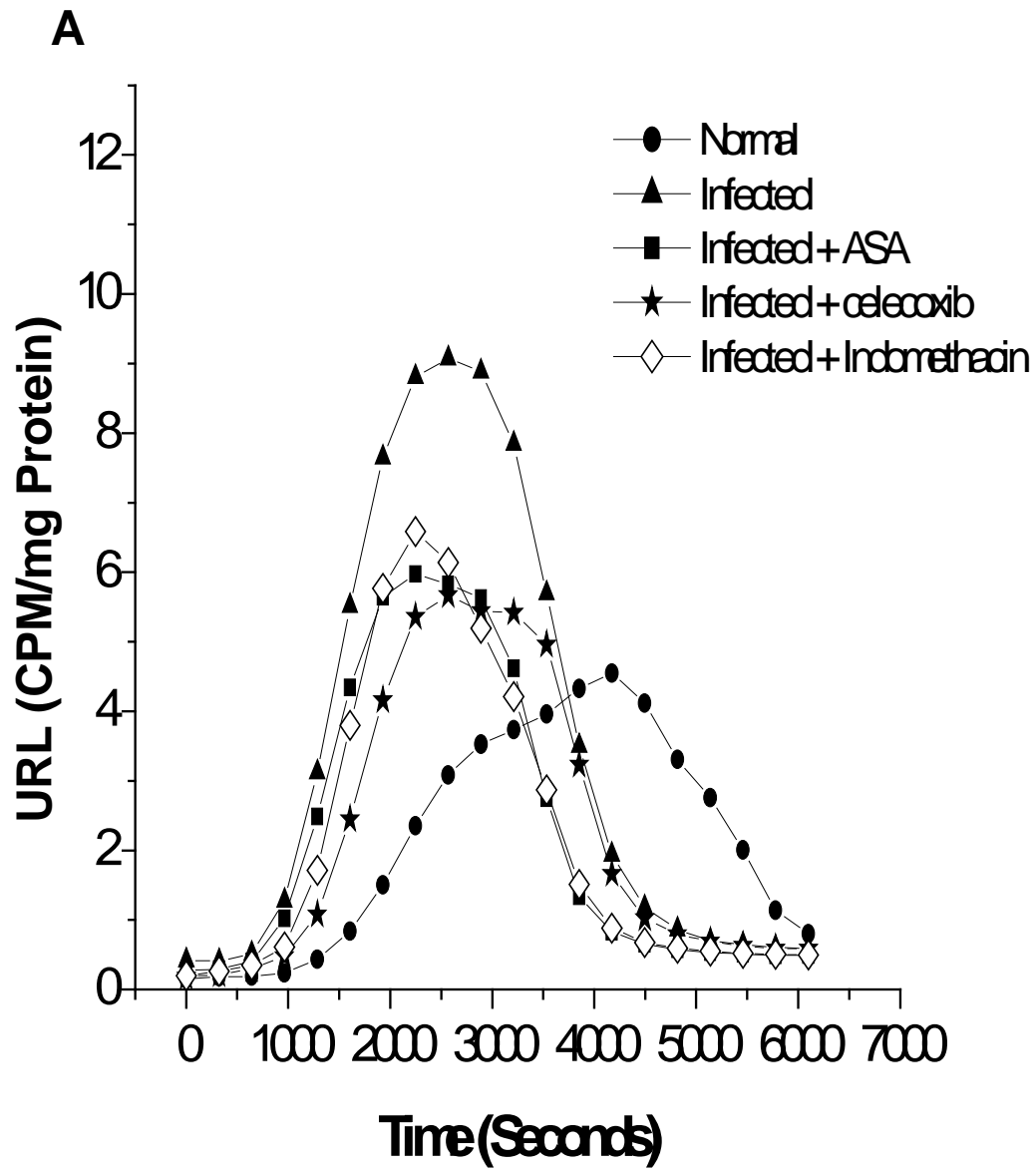


Figure 9A

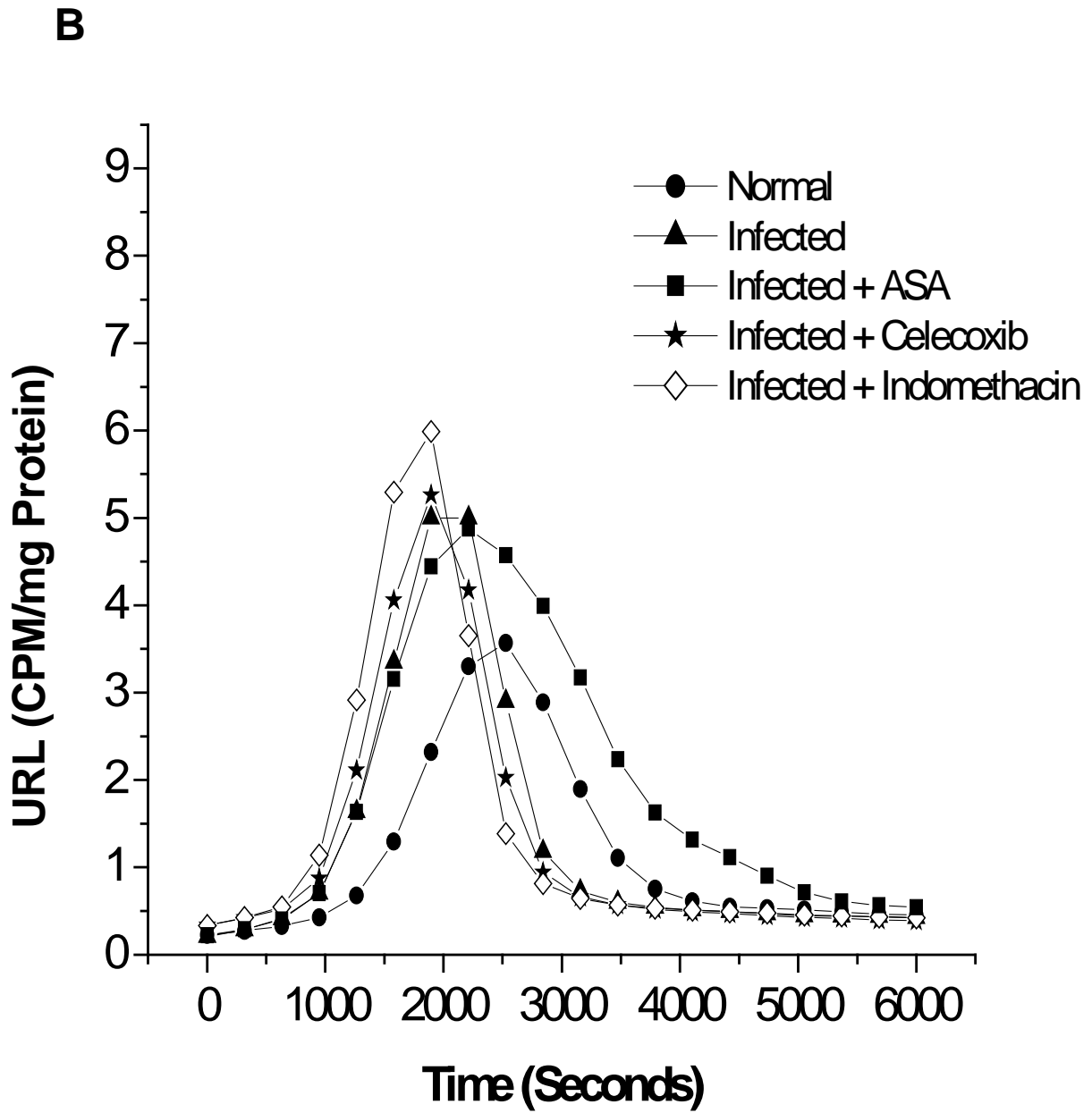


Figure 9B

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)