

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO E DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NO  
INFILTRADO INFLAMATÓRIO E NA PARASITEMIA DE  
CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS NA FASE AGUDA DA  
INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

ARIANA DE MELO BORGES

Uberaba – MG

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ARIANA DE MELO BORGES**

**INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO E DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NO  
INFILTRADO INFLAMATÓRIO E NA PARASITEMIA DE  
CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS NA FASE AGUDA DA  
INFECCÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia Clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Clínica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Antoniazi Michelin

Co-Orientador: Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Uberaba – MG

Setembro, 2008

*Aos meus pais, Paulo e Ângela, que  
sempre me deram amor, estímulo e ânimo.  
Exemplos de luta, coragem e amor. E aos  
meus irmãos, por todo companheirismo e  
cumplicidade.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Márcia Antoniazzi Michelin, por ter sido minha orientadora, por ter acreditado em mim, por ser exemplo de pessoa e profissional e por ter contribuído com minha formação. E principalmente por ter sido não somente orientadora, mas uma amiga.

Ao Prof. Dr. André Pedrosa, pela co-orientação, sugestões e paciência para com sua aluna durante a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior e seus colaboradores, pelo espaço cedido para execução dos procedimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Ramirez Giraldo e sua equipe, pelo fornecimento das cepas, como também por terem aberto seu laboratório para alguns procedimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sheila Jorge Adad, por toda a atenção e paciência disponibilizada, com sugestões e críticas a esta tese.

A todos os colegas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela cumplicidade, companheirismo e por atitudes que contribuíram na minha caminhada e me incentivaram aos estudos.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional, sempre escutando, estimulando e acreditando em mim, quando muitas vezes eu não acreditava.

Ao amigo George Kemil Abdalla, por inegável demonstração de amizade, pela atenção dedicada e por experiências repassadas.

Aos amigos que sempre estiveram presentes, apoiando e demonstrando o quão importante é uma amizade verdadeira.

Aos amigos pós-graduandos que contribuía com experiências e palavras animadoras, quando muitas vezes me sentia derrotada.

A todos os professores que contribuía na formação do meu conhecimento.

A Deus, pela minha existência e principalmente por ter me presenteado com tantas pessoas maravilhosas em minha vida.

## **METADE**

(Oswaldo Montenegro)

*Que a força do medo que tenho não me impeça de ver o que sinto.  
Que a morte de tudo que acredito não me tape os ouvidos e a boca,  
porque metade de mim é o grito, mas a outra metade é o silêncio.*

*Que a música que ouço ao longe seja linda e  
que a pessoa que eu amo  
Esteja sempre amada, mesmo que distante,  
porque metade de mim é partir e a outra metade é saudade.*

*Que as palavras que falo não sejam ouvidas como prece  
e nem repetidas com fervor, apenas respeitadas,  
como a única coisa que resta numa pessoa inundada de sentimentos,  
porque metade de mim é o que ouço e a outra, é o que calo.*

*Que essa minha vontade de ir embora  
se transforme na calma e na paz que eu mereço,  
que essa tensão que me corrói por dentro seja um dia recompensada,  
porque metade de mim é o que penso e a outra metade é o vulcão.*

*Que o medo da solidão se afaste  
e que o convívio comigo mesmo se torne ao menos suportável,  
que o espelho reflita em meu rosto um doce sorriso  
que eu me lembro de ter dado na infância,,  
porque metade de mim é lembrança do que fui e a outra metade...eu não sei.*

*Que seja preciso mais que uma simples alegria  
para me fazer aquietar o espírito,  
e que o teu silêncio me fale cada vez mais,  
porque metade de mim é abrigo, mas a outra metade é cansaço.*

*Que a arte aponte uma resposta  
mesmo que eu não saiba e que ninguém a tente complicar,  
porque é preciso simplicidade para fazê-la florescer,  
porque metade de mim é platéia e a outra metade é canção.*

*Que minha loucura seja perdoada,  
porque metade de mim é amor e a outra... também....*

## RESUMO

A Doença de Chagas afeta, em toda a América Latina, aproximadamente 20 milhões de pessoas. O *Trypanosoma cruzi*, após a infecção, invade diferentes tipos celulares, incluindo células musculares cardíacas e esqueléticas, onde fazem novos ciclos intracelulares, neles podendo causar lesões de intensidade variável. O principal tecido acometido é o cardíaco, onde se dá a manifestação de miocardite grave, relacionada com a presença de parasitas intracelulares. A lesão cardíaca observada durante a infecção pelo *T. cruzi* apresenta-se com grande infiltrado inflamatório e parasitismo tecidual e fibrose. Inibidores da COX-2, enzima responsável pela síntese de PGE<sub>2</sub>, são capazes de diminuir o infiltrado inflamatório, bem como favorecer a diminuição da parasitemia na fase aguda da doença de Chagas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação conjunta do estrógeno e deste mediador inflamatório na parasitemia e no infiltrado inflamatório durante a fase aguda da doença de Chagas, comparando para tal a infecção em camundongos machos e fêmeas, tratados ou não com drogas inibidoras da COX-2.

Camundongos BALB/C foram divididos em 6 grupos, infectados com 300 formas de *T. cruzi* e tratados diariamente com PBS e Etoricoxib. Um grupo não infectado de machos e outro de fêmeas foram utilizados como controle negativo. A parasitemia foi observada do 5º ao 19º dia de infecção, sendo que no 21º os animais foram sacrificados e tiveram seus corações retirados para estudo morfométrico e baço para cultura com posterior determinação de NO. Nossos resultados demonstraram que a parasitemia e o infiltrado inflamatório nos animais tratados com inibidor da COX-2 foram menores do que no grupo tratado com PBS, em ambos os sexos, com uma parasitemia menor em camundongos fêmeas. Porém, a produção de NO foi maior no grupo dos camundongos machos.

Os dados obtidos nos permitem concluir que animais cuja síntese de prostaglandina via COX-2 se encontra inibida apresentam um menor infiltrado inflamatório e parasitemia, independente do sexo. Contudo, no grupo-controle pudemos observar que as fêmeas apresentam uma menor parasitemia, acompanhada por um maior infiltrado cardíaco. Apesar disto, camundongos machos apresentaram um nível alto de NO nos macrófagos peritoneais durante a infecção por *T. cruzi*.

Palavras-Chave: Doença de Chagas, óxido nítrico, prostaglandina, infiltrado inflamatório.

## ABSTRACT

Chagas's disease affects approximately 20 million people in Latin America. After the infection *T. cruzi* invade different cell types, including cardiac and skeletal muscle cells, where they make new intracellular cycles being possible to cause variable intensity lesions. It most affects the cardiac tissue, which manifestation is the severe myocarditis, related to the presence of intracellular parasites. Cardiac lesion observed during the infection by *T. cruzi* is presented with high inflammatory infiltrate and tissue parasitism and fibrosis. COX-2 inhibitors, enzyme responsible for the PGE<sub>2</sub> synthesis, are capable of diminishing the inflammatory infiltrate, as well favoring the decreasing of parasitemia in the acute phase of the Chagas disease. The aim of this study was to evaluate the action of the estrogen and the inflammatory mediator in parasitem and in the inflammatory infiltrate during the acute phase of the Chagas disease, making a comparison with the male and female mice infection, treated or not with inhibitor COX-2 drugs.

24 BALB/C mice were divided into 6 groups, infected with 300 forms of *T. cruzi* and daily treated with PBS and Etoricoxib. A male non-infected group and another female one were used as negative control. Parasitem was observed from the 5<sup>th</sup> to the 19<sup>th</sup> day of infection, being the 21<sup>st</sup> the day animals were killed and had their hearts taken off for a morphometric study and the spleen for the culture with posterior determination of NO. Our results demonstrated that parasitem and the inflammatory infiltrate in the animals treated with COX-2 inhibitor were lower than in the group treated with PBS, in both sexes, with a lower parasitem in female mice. However, NO production was higher in the male mice group.

Data obtained make get to a conclusion that animals which prostaglandin synthesis via COX-2 is inhibited, present a lower inflammatory infiltrate and parasitem, irrespective of the sex. However, in the control group we could observe that the female ones present a lower parasitem, followed by a higher cardiac infiltrate. Despite that, male mice presented a high level of NO in the peritoneal macrophages during the infection by *T. cruzi*.

Keywords: Chagas's disease, nitric oxide, prostaglandin, inflammatory infiltrate.

## LISTA DE ABREVIATURAS

µl: microlitro

µm: micrômetro

°C: graus Celsius

% : porcentagem

x<sup>2</sup>: Teste do qui-quadrado

“t”: Teste de Student

ANOVA: Análise de Variância

Con-A: Conavalina A

COX: Ciclooxigenase

Etori: Etoricoxib

HE: Coloração de Hematoxilina-eosina

IFN : Interferon

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida

g: gramas

KO: *Knock-out*

L-NMNA: Inibidor L-arginina

LPS: Lipopolissacarídeo

MHC: Molécula de Histocompatibilidade

NK: Células Natural Killer

NO : Óxido Nítrico

PBS: *Phosphate Buffer*

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

PG: Prostaglandina

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>

RAG: Genes de recombinase ativa

SC : Células Esplênicas

*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*

Th<sub>0</sub>: Linfócitos T Auxiliares Padrão O

Th<sub>1</sub>: Linfócitos T Auxiliares Padrão 1

Th<sub>2</sub>: Linfócitos T Auxiliares Padrão 2

TGF- $\beta$ : Fator de Transformação e Crescimento Beta

TNF: Fator de Necrose Tumoral

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de tratamento dos animais infectados ou não infectados.....	28
Tabela 2 – Avaliação qualitativa da Miocardite nos grupos experimentais.....	34
Tabela 3 – Valores Médios do número de leucócitos no miocárdio, de acordo com os grupos de estudo analisados em 30 campos (19 mm <sup>2</sup> ).....	36
Tabela 4 – Porcentagem de leucócitos por campo nos diferentes grupos experimentais.....	37

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Parasitemia dos animais experimentais tratados ou não com Etoricoxib durante o 5° e 19° dia de infecção com 300 formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
Gráfico 2 – Curva de Sobrevida dos grupos experimentais tratados ou não com Etoricoxib durante a infecção com 300 formas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
Gráfico 3 – Comparação da porcentagem de leucócitos por campo entre os diferentes grupos experimentais durante 21 dias de infecção com 300 formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y.....	38
Gráfico 4 – Níveis de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , sem estímulo com LPS.....	38
Gráfico 5 – Níveis de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , estímulo com LPS.....	39
Gráfico 6 – Níveis de óxido nítrico em cultura de células esplênicas dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , sem estímulo com LPS.....	40
Gráfico 7 – Níveis de óxido nítrico em cultura de células esplênicas dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , estímulo com LPS.....	40

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Miocárdio do grupo Controle Macho corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.....	35
Figura 2 – Miocárdio do grupo Controle Fêmea corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.....	35
Figura 3 – Miocárdio do grupo Infectado tratado com Etori Macho corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.....	35
Figura 4 – Miocárdio do grupo Infectado tratado com Etori Fêmea corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.....	35
Figura 5 – Miocárdio do grupo infectado tratado com PBS Macho corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.....	35
Figura 6 – Miocárdio do grupo Infectado tratado com PBS Fêmea corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.....	35

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Doença de Chagas.....	14
1.2 Resposta Imune na Doença de Chagas.....	17
1.3 Imunossupressão na Doença de Chagas.....	22
1.3.1 Papel Imunossupressor do NO.....	22
1.3.2 Papel Imunossupressor da PGE <sub>2</sub> .....	22
1.4 Aspectos morfológicos.....	24
1.5 Justificativa .....	26
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Infecção e tratamento dos animais.....	28
3.2 Parasitemia.....	29
3.3 Estudo anatomopatológico.....	29
3.3.1 Infiltrado inflamatório.....	29
3.4 Obtenção, cultura das células e coleta dos sobrenadantes e posterior dosagem do NO.....	30
3.5 Determinação da concentração de óxido nítrico.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Parasitemia .....	32
4.2 Sobrevida dos grupos experimentais.....	33

4.3 Estudo histopatológico do parênquima cardíaco – Infiltrado inflamatório.....	33
4.3.1 Avaliação Qualitativa da presença de Miocardite.....	34
4.4 Dosagem do Óxido Nítrico.....	38
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas (tripanosomíase americana) é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909; é uma importante doença parasitária crônica (CHAGAS, 1909). O *Trypanosoma cruzi* infecta mais de 18 milhões de pessoas na América Latina, sendo responsável pela alta prevalência, morbidade e letalidade (TEIXEIRA; GAZZINELI; SILVA, 2002). Estima-se que em uma população de cerca de 360 milhões de habitantes de países endêmicos, pelo menos 90 milhões de pessoas (25%) estejam sob risco de infecção e cerca de 20 milhões estejam infectados (WHO, 1991; ABEL *et al.*, 2001; ALMEIDA-LEITE *et al.*, 2007). No Brasil, esta parasitose constitui um dos mais graves problemas de saúde pública devido a sua alta prevalência e expressiva morbimortalidade. Em 1991, segundo dados do Ministério da Saúde, havia em torno de 5 milhões de infectados, e acredita-se que metade seja apenas portadora, apresentando alguma manifestação clínica; e somente a outra metade chegaria a óbito decorrente da consequência direta ou indireta (SOUZA, 2000; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007).

De acordo com a forma de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, a Doença de Chagas pode ser adquirida ou congênita, sendo a primeira, a mais freqüente. A adquirida habitualmente se adquire através da picada de triatomíneos (vetores), que favorece a contaminação pelo contato das dejeções do inseto infectado com as mucosas ou tecido epitelial. Outras formas de transmissão, porém menos freqüentes, são pela via transplacentária, pelo leite materno, pela via digestiva, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (SOUZA, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e inclui duas formas extracelulares e intracelulares nos hospedeiros mamíferos. Na forma extracelular, a forma tripomastigota, não se divide, está presente na corrente circulatória de hospedeiros mamíferos. Essa forma é ingerida pelo inseto vetor (triatomíneos da família Reduviidae) após o repasto sanguíneo. No intestino médio do inseto, tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas que se multiplicam e migram para o intestino posterior, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos. Essa é a forma infectante que é excretada com as fezes e infecta hospedeiros vertebrados, passando através de mucosas ou lesões na pele. Eles, então, invadem células

vizinhas, diferenciando-se em amastigotas. Após a multiplicação no citoplasma, amastigotas transformam-se em tripomastigotas. As formas amastigota e tripomastigota são liberadas na corrente circulatória e tecidos adjacentes após a ruptura das células do hospedeiro. Assim, formas tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares, incluindo células musculares cardíacas e esqueléticas, onde fazem novos ciclos intracelulares, neles podendo causar lesões de intensidade variável (DaROCHA *et al.*, 2002).

Depois de adquirida, a doença de Chagas pode se dividir em duas fases: a aguda e a crônica, e ambas podem ser subdivididas em duas outras formas: em assintomática e sintomática (CHAGAS, 1911). A fase aguda pode se caracterizar por alta parasitemia, intensidade do processo inflamatório e pode ser assintomática (mais comum) ou sintomática, com febre, mal-estar, edemas, hepatoesplenomegalia, infartamento ganglionar generalizado e taquicardia, elementos diretamente relacionados com a defesa celular (ANDRADE, 1958). As pessoas infectadas desenvolvem uma resposta imune que controla a proliferação dos parasitas (BRENER, 1987).

A fase aguda dura entre 10 a 60 dias. Após esse período há diminuição dos parasitas na circulação, não sendo encontrados normalmente na fase crônica. Na maioria das vezes, o início da infecção é acompanhado de sintomas e sinais locais, decorrentes da penetração do parasita e representado pelo sinal de Romaña ou pelo chagoma de inoculação, com formação de uma lesão exsudativa proliferativa, acompanhada de reação ganglionar satélite (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948; ANDRADE, 1958). Essa fase apresenta um curso clínico curto e reações inflamatórias nos tecidos parasitados (DIAS, 1984). O principal tecido acometido é o cardíaco, o que provoca, no tecido, a miocardite grave, relacionada com a presença de parasitas intracelulares (ANDRADE, 1982; PRATA; MACÊDO, 1984; PRATA, 2001). Os sintomas e sinais da infecção inicial são, em regra, transitórios, regredindo parcial ou totalmente após os primeiros meses de doença (geralmente, após dois a quatro meses). Alguns doentes morrem durante essa fase (quase sempre crianças), com manifestações de meningoencefalite, ou insuficiência cardíaca, ou ambas. Sem tratamento, a mortalidade decorrente dessas causas é de cerca de 5 a 10% (PRATA, 2001). Na maioria das vezes, porém, a doença se desenvolve de maneira favorável, passando a uma fase de cronicidade mais ou menos assintomática (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948).

Foi descrita, também, uma forma assintomática da fase aguda, em que os sintomas são brandos e os pacientes são aparentemente imunorregulados (BRENER, 1987).

Durante a primeira semana de infecção em humanos por *T. cruzi*, tripomastigotas podem ser detectadas por exame microscópico em sangue fresco. No final de dois meses de infecção, tripomastigotas diminuem, não sendo detectados níveis intracelulares de amastigotas. Sendo a proliferação controlada por resposta imune adaptativa, baixos níveis de parasitismos intracelulares teciduais persistem durante a vida do hospedeiro. Pode-se detectar presença de anticorpos séricos da classe IgG, sendo importantes para o diagnóstico sorológico (HOFT *et al*, 2000).

Depois de dois a quatro meses, as manifestações clínicas agudas desaparecem e os parasitas são raramente detectados no sangue periférico, podendo apenas haver essa possibilidade por meio de métodos parasitológicos de xenodiagnóstico e hemocultura (BRENER, 1987). O parasitismo tissular é escasso. Pode ser observado através de técnicas, tais como imunohistoquímica, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *in situ* ou PCR padrão são aplicadas para a detecção de *T. cruzi* nos tecidos doentes de hospedeiros com infecção crônica (TARLETON; ZHANG, 1999). A doença entra na fase crônica, geralmente começando com um longo período assintomático, chamado de forma indeterminada, que acomete a maioria dos doentes (50 a 60%) e persiste de dez a trinta anos ou por toda a vida. Cerca de 20 a 30% desenvolvem, após 10 a 20 anos de infecção, miocardiopatia de gravidade variável; 8 a 10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por dilatações do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e megacólon). Os demais pacientes apresentam associação das manifestações cardíaca e digestiva, conhecida como forma mista (BRENER, 1987).

A doença de Chagas crônica pode acometer também o trato digestivo e o sistema nervoso. A forma digestiva pode acometer esôfago ou cólon. Uma das manifestações mais precoces do megaesôfago é a incoordenação dos movimentos peristálticos do esôfago, que mais tarde são seguidos por dilatação, disfagia e sintomas relacionados. Constipação prolongada é o principal sintoma do megacólon, que apresenta diferentes graus de dilatação (BRENER, 1987).

No megaesôfago e megacólon há sempre algum grau de destruição do sistema nervoso autônomo, que precede as alterações de motilidade. Há grave desnervação na presença de esôfago de calibre normal. Existem lesões nas camadas musculares, mas não se sabe se são primárias ou secundárias (KÖEBERLE, 1957; PRATA, 2001).

A forma indeterminada da doença de Chagas crônica tem grande importância epidemiológica em áreas endêmicas. Durante o período assintomático, os indivíduos

podem ser considerados como pertencentes à categoria de cardíacos em potencial (ANDRADE, 1958; ANDRADE, 1982; DIAS, 1989).

A forma indeterminada é caracterizada por positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos, ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma convencional normal, e coração, esôfago e cólons radiologicamente normais. Esses critérios estão de acordo com a Validade do Conceito de Forma Indeterminada da Doença de Chagas, apresentado em 1985.

A evolução clínica de pacientes com a forma indeterminada é geralmente lenta e benigna. Em longo prazo, a evolução desses pacientes é favorável, e eles, geralmente, morrem de outras causas (DIAS, 1989).

Camundongos infectados com *T.cruzi* têm sido usados como modelo para doença humana, porque também desenvolvem parasitemias detectáveis durante infecção aguda, seguida por fase crônica de parasitismo tecidual. Diferentes linhas de camundongos exibem vários padrões da doença podendo variar dependendo de diferentes isolados de *T. cruzi* usados (HOFT *et al.*, 2000).

Hipóteses têm sido levantadas para explicar as lesões patológicas no coração infectado de pacientes, incluindo: a) a persistência da infecção; b) antígenos parasitários nos sítios da inflamação ou; c) o papel importante dos processos autoimune (TARLETON, 1988; BRENER; GAZZINELLI, 1997). O descuido do mecanismo básico do início e manutenção de *carditis*, infecção crônica, sucede a infecção do tecido, que é acompanhada por fibrose tecidual e determina o resultado clínico do paciente. Por contraste, é essencial que parte dos tecidos inflamados seja resposta de proteção do hospedeiro contra a infecção. Com isso, encerramos o entendimento do mecanismo dos eventos moleculares. Enfatizando o tecido inflamado tem sido o mecanismo responsável pelo controle do parasita e da inflamação, associada com o tecido danificado durante a fase aguda e crônica da infecção (TEIXEIRA *et al.*, 2002; BILATE; BENVENUTI; GUTIERREZ, 2007; CUNHA-NETO, 2008).

## **1.2 Resposta Imune na Doença de Chagas**

As manifestações clínicas da doença de Chagas no homem se devem à resposta imune dirigida ao parasita. A infecção por *Trypanosoma cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imunológico, ocasionando o aparecimento de respostas humorais e celulares contra o parasita (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000). A

participação do sistema imune na resistência à infecção está bem documentada, não havendo, entretanto, consenso sobre a contribuição específica de cada componente. Muitas evidências mostram a participação das células B, células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), células *Natural Killer* (NK) e macrófagos no controle da infecção (LAUCELLA; ROTTENBERG; TITTO, 1996).

Parece que, particularmente nos estágios iniciais, a resposta imune é protetora. No entanto, o tripanosoma é capaz de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro e sobreviver, apesar da reação imune contínua que se desenvolve. Na fase crônica, a resposta imunológica pode ser prejudicial para o hospedeiro, por meio de componentes auto-agressivos (ABATH, 1983; ANDRADE *et al.*, 2006).

A infecção de camundongos por *T. cruzi* causa imunossupressão do compartimento de células T e inflamação cardíaca crônica, que se assemelha à infecção humana. A apoptose induzida por ativação de células T CD4<sup>+</sup> é uma característica importante da infecção experimental e poderia ter função na imunossupressão e persistência do parasita em hospedeiros infectados (LOPES *et al.*, 1995). Outros resultados sugerem que a apoptose contínua de linfócitos e a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos tenham papel na persistência do parasita (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

Em relação à imunidade inata, estudos mostraram que o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina de efeito protetor na infecção experimental por *T. cruzi*, levando à ativação de macrófagos e prevenindo a doença aguda, a imunossupressão e a morte de camundongos infectados (REED, 1988). Em estudo, foi mostrado que IFN- $\gamma$  ativa macrófagos infectados a inibir a replicação intracelular de *T. cruzi* por mecanismos que envolvem a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO) (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Martins e colaboradores (1998), utilizando camundongos Knock-out para IFN- $\gamma$ , investigaram o papel desta citocina na indução de apoptose e proteção do hospedeiro durante a infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*. Confirmaram que o IFN- $\gamma$  tem um papel crucial na defesa do hospedeiro ao parasita, controlando a resposta imune, pela indução de NO, o qual leva à indução de apoptose durante a infecção experimental pelo parasita, com a morte deste, promovendo uma estabilidade da doença, levando à fase crônica da infecção em camundongos.

No entanto, há várias evidências de que a resposta inata ao *Trypanosoma cruzi* se auto-regula, reduzindo a ativação dos macrófagos e a produção local de NO. As citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$  inibem *in vitro* a produção de NO e a atividade tripanomicida

de macrófagos infectados e ativados por IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Relata-se em diversos trabalhos que a IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  correlacionam-se com a resistência à infecção por *T. cruzi*, TGF- $\beta$  e IL-10 promovem suscetibilidade. Os resultados dão suporte para o papel da imunidade inata no controle da infecção por *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1998). Outro trabalho demonstrou que a infecção por *T. cruzi* resulta no aumento da atividade de células NK nos esplenócitos e na indução da atividade dessas células na cavidade peritoneal de camundongos infectados experimentalmente (HATCHER *et al.*, 1981).

A partir desses resultados, é possível sugerir que a produção de IFN- $\gamma$ , precoce e independente de células T, é um importante elemento da resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*, desencadeada pela secreção de IL-12 por macrófagos (REIS *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 2006).

Outra citocina importante na suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* é o Fator de Transformação e Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ). O TGF- $\beta$  provocou aumento da parasitemia e exarcebou a suscetibilidade de camundongos C57BL/6 (suscetíveis). O estudo mostrou que essa citocina é uma potente inibidora dos efeitos de ativação de citocinas por macrófagos *in vivo* e *in vitro*, apresentando papel na regulação da infecção (SILVA; TWARDZIK; REED, 1991).

Os papéis de IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-12 foram estudados no controle do parasitismo pelas imunidades inata e adaptativa. Camundongos *Knock-out* (KO) para o gene da IL-10 (IL-10 KO) infectados com a cepa Y de *T. cruzi* apresentaram menor número de parasitas no sangue e tecidos e maior produção de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico pelas células do baço do que o tipo selvagem. O tratamento de camundongos IL-10 KO e selvagens com IL-10 recombinante resultou em aumento da parasitemia. Camundongos *Knock-out* para os genes da recombinase ativa (RAG/KO), que não possuem células B e T, fornecem um modelo para determinar a importância da imunidade inata na resistência. Camundongos RAG/KO e selvagens tiveram níveis de parasitemia semelhantes até o 13º dia da infecção, sugerindo o controle efetivo do parasitismo pelo sistema imune inato durante a fase inicial da infecção. A partir de então, foi maior em RAG/KO. O tratamento de camundongos RAG/KO, IL-10 KO e selvagens com anticorpos neutralizantes anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF ou anti-IL-12 aumentou os níveis de parasitemia, mostrando a importância da produção endógena dessas citocinas no controle do parasitismo pelas respostas inata e adaptativa. Células do baço de camundongos selvagens tratadas com anti-IL-12

apresentaram produção diminuída de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico, sugerindo que a produção de IFN- $\gamma$  é dependente do estímulo de IL-12 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996).

Höhler e colaboradores (1998) puderam demonstrar a importância do IFN- $\gamma$ , quando, utilizando camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  e inibidores da NO sintase (iNOS), conseguiram demonstrar que ambos animais apresentavam susceptibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Este resultado levou os pesquisadores a concluir o quanto o IFN- $\gamma$  e NO mediado pela iNOS são cruciais para a atividade tripanocida dos macrófagos e sobrevivência dos camundongos na fase aguda da infecção chagásica.

Esplenócitos obtidos durante a fase aguda da infecção produziram quantidades elevadas de NO que foram correlacionadas com a resistência ou suscetibilidade dos animais. Níveis de nitrito e nitrato no plasma durante estágios avançados da infecção foram maiores em camundongos C57BL/6 do que em BALBL/c. O tratamento de camundongos C57BL/6 com inibidores da NO sintase aumentou a parasitemia e a mortalidade. Finalmente, foi encontrada uma droga doadora de NO capaz de matar tripomastigotas *in vitro*, na ausência de quaisquer outras células, sugerindo a morte de *T. cruzi* mediada diretamente por NO (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994; COSTA *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que camundongos infectados por *T. cruzi* e deficientes no receptor de IFN- $\gamma$  ou deficientes iNOS foram altamente suscetíveis à infecção, tiveram parasitemias elevadas e histopatologia grave. Ambas as linhagens de camundongos foram incapazes de responder à infecção devido à atividade tripanocida prejudicada de macrófagos, causada pela deficiência na produção de óxido nítrico. Esse estudo demonstrou uma via de indução de iNOS dependente de IFN- $\gamma$  crucial para a eficiente produção de óxido nítrico na resistência à infecção aguda por *T. cruzi* (HÖLHER *et al.*, 1998).

O tratamento de camundongos infectados com L-NMMA (inibidor da L-arginina), e anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IFN- $\gamma$  causou redução na produção de NO e na quantidade de células apoptóticas, sugerindo que NO, produzido por macrófagos ativados por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , tem papel direto na indução da apoptose *in vivo* (MARTINS *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* estimulam a produção de TNF- $\alpha$  por células do baço (TARLETON, 1988).

Verificou-se que TNF- $\alpha$  teve efeito protetor contra a multiplicação de parasitas na fase inicial da doença, agindo na indução de células inflamatórias para alvos teciduais (miocárdio), provavelmente diminuindo a carga parasitária (LIMA *et al.*, 1997).

No entanto, em outro estudo, TNF- $\alpha$  foi encontrado no citoplasma de macrófagos e dentro de áreas necróticas do baço de camundongos Swiss, C3H/He e DBA. Esse resultado sugere que TNF- $\alpha$  tem papel importante nas alterações necróticas do baço associadas com a gravidade da infecção experimental por *T. cruzi* (LIMA; ANDRADE; ANDRADE, 2001).

Apesar do papel protetor claro da resposta inata inicial, tripomastigotas infectantes vivos podem desencadear a resposta por macrófagos que pode ser protetora para o hospedeiro (IL-12) ou para o parasita (IL-10), e na ausência de linfócitos. A extensão da infecção parece ser função do balanço entre efeitos antagonistas exercidos sobre os macrófagos (REIS, 1993).

É interessante observar que *T. cruzi* é um estímulo poderoso para resposta imune inata montada por macrófagos e células NK. Com o estímulo persistindo ao longo da infecção, seria importante avaliar a contribuição da resposta inata para imunopatologia na fase crônica (REIS, 1993).

Os resultados obtidos em experimentos com camundongos infectados por *T. cruzi* estabelecem que citocinas Th1, que estão envolvidas na hipersensibilidade tardia, são induzidas durante a infecção aguda e parecem ter papel obrigatório na eliminação do parasita (CUNHA-NETO *et al.*, 1995).

Os níveis séricos de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram estudados em pacientes com doença de Chagas crônica (forma indeterminada, cardiopatia insipiente, cardiopatia bem estabelecida, forma digestiva e forma mista). Os níveis séricos de TNF foram indetectáveis e de IFN- $\gamma$  não diferiram nas diferentes formas clínicas ou com a gravidade da doença. No entanto foram encontrados níveis mais elevados de IL-2 em pacientes com cardiopatia descompensada, sugerindo que a dosagem dessa citocina possa servir como indicadora da necessidade de terapêuticas mais agressivas nesses pacientes (WARD *et al.*, 1999).

A demonstração clara da participação da imunidade humoral na resistência à infecção experimental por *T. cruzi* foi evidenciada em um estudo de transferência passiva de anticorpos. Os resultados sugerem que a imunidade humoral participa da resposta imune protetora contra *T. cruzi* (KRETTLI; BRENER, 1976).

Em todas as formas clínicas da doença de Chagas crônica, o envolvimento da imunidade mediada por células é de fundamental importância. Nesse contexto, alguns estudos relataram o papel de mecanismos citotóxicos no desenvolvimento das manifestações clínicas mais graves (REIS *et al.*, 1993).

### **1.3. Imunossupressão na Doença de Chagas**

#### **1.3.1 Papel imunossupressor do NO:**

Relata-se na literatura a importância do NO como microbicida na doença de Chagas. Em contrapartida durante a infecção experimental, tem sido demonstrado que o NO também induz imunossupressão (ABRAHAMSOHN; COFFMANN, 1996).

Na doença de Chagas, os mecanismos pelos quais o NO exerce função imunossupressora ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto foi demonstrado que o NO pode inibir a apresentação de antígenos por macrófagos regulando negativamente a expressão de moléculas MHC (SICHER *et al.*, 1994). Outros estudos revelam que o NO pode alterar o funcionamento de complexos enzimáticos no metabolismo celular, inibir a duplicação de DNA, ou causar danos diretos no DNA sugerindo que o NO não só pode inibir a replicação, mas também pode induzir a morte celular (GRANGER; LEHNINGER, 1982).

Para confirmar o papel do IFN- $\gamma$  e NO na imunossupressão, Goni e colaboradores (2002), utilizaram camundongos knock-out em IFN- $\gamma$ R ou iNOS. Verificando que as células esplênicas (SC) de camundongos não infectados, também KO, proliferaram exatamente como as células dos controles, que eram das linhagens Sv129 e C57BL/6 respectivamente, em resposta a Conavalina A (Con-A). Entretanto, a resposta de SC dos animais KO infectados a Con-A foi minimamente depreciada (cerca de 20 a 30% de inibição) comparados com os controles. A produção de NO foi grandemente diminuída em SC ativadas com Con-A nos animais KO iNOS. Em concordância, a carência de produção significativa NO, L-NMMA não afetou a proliferação pelas SC nestes animais infectados. Chegaram à conclusão de que os animais KO apresentaram uma alta parasitemia, porém muito pouca imunossupressão, afirmando que neste caso, a imunossupressão não foi necessária para o desenvolvimento do parasita, pois o mesmo pôde crescer melhor devido à facilidade de os animais serem KO. Sendo assim, a imunossupressão não seria necessária pelo parasita e sim, uma resposta excessiva do sistema imune, levando aos danos.

#### **1.3.2 Papel imunossupressor da PGE<sub>2</sub>:**

A PGE<sub>2</sub> tem sido importante por induzir imunossupressão juntamente com o NO; as prostaglandinas têm inúmeros efeitos cardiovasculares e inflamatórios (VANE; BOTTING,

1992; MONCADA *et al.*, 1991). A ciclooxigenase (COX) é a primeira enzima na produção do ácido araquidônico sendo convertido a Prostaglandina (PG), prostaciclina e tromboxane A<sub>2</sub> (VANE; BOTTING, 1990; SMITH; MARNETT, 1991).

As PGs são pequenas moléculas lipídicas que regulam numerosos processos no organismo, incluindo função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e modulação da função imune (HARRIS *et al.*, 2002). Existem duas isoformas de ciclooxigenases: a COX-1, que é constitutiva; e a COX-2, que é induzida por mediadores inflamatórios (VANE; BOTTING, 1992).

O Etoricoxib é um antiinflamatório não-hormonal inibidor da COX-2, lançado no Reino Unido pelo laboratório Merck. Os inibidores da COX-2 atuam no tratamento de dor crônica (principalmente de causa ósteo-articular), de dismenorréia primária e da dor aguda, por exemplo, como coadjuvante na analgesia pós-operatória e em crises de gota. O Etoricoxib é um antiinflamatório não-hormonal bem absorvido por via oral e com alta seletividade pela COX-2 nas doses usualmente prescritas. A inibição da COX-2 por esta medicação promete efeitos analgésicos e antiinflamatórios potentes com riscos mínimos para o trato gastrointestinal. Segundo dados divulgados pela Merck, produziria inibição dose dependente da COX-2 sem inibir a COX-1 em doses diárias superiores a 150 mg. O etoricoxib não inibe a síntese gástrica de prostaglandinas e não tem efeitos sobre a função plaquetária. Contudo têm metabolismo hepático e podem interferir com drogas que se utilizam das mesmas vias metabólicas. Apresentam efeitos colaterais comuns dos antiinflamatórios que vão desde anafilaxia e alterações sanguíneas a efeitos sobre a função renal dentre outros (RIENDEAU; PERCIVAL, 2001; IBRAHIM *et al.*, 2002; AZOUBEL *et al.*, 2007; DAMOSA *et al.*, 2008).

Vários trabalhos demonstram a ação inibitória da PGE<sub>2</sub> sobre a síntese de NO (SOWA *et al.*, 1994; HIROKAWA *et al.*, 1994; PINGE FILHO *et al.*, 1999). Há na literatura relatos que indicam que PGE<sub>2</sub> pode atuar diretamente nas células B para aumentar a produção de IgE e IgG1 induzida por IL-4. Os efeitos de PGE<sub>2</sub> nas células T precisam ser também considerados, pois linfocinas de células T são críticas na mudança de isotipos. Os Th de camundongos têm sido separados em subgrupos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, baseados na síntese de IL-2 e IFN- $\gamma$  para Th<sub>1</sub> e IL-4 e IL-5 para o subgrupo Th<sub>2</sub> (MOSSMAN *et al.*, 1986).

A PGE<sub>2</sub> não afeta somente o balanço de IL-2/ IL-4, mas também atuam quando secretadas por macrófagos e outras células no início da resposta imune, e regulam

negativamente IFN- $\gamma$ , que é importante para a regulação positiva de moléculas MHC classe II e para a mudança de isotipo de Ig para IgG2a (WALKER *et al.*, 1983), mas não a síntese de IL-4. Desta forma, a secreção de PGE<sub>2</sub> favoreceria uma resposta do tipo Th<sub>2</sub>, levando também à produção de IgG1 e IgE por células B (PHIPPS *et al.*, 1991; ROPPER; PHIPPS, 1994).

Experimentos realizados *in vitro* e também na fase aguda da doença de Chagas demonstraram que PGE<sub>2</sub> induz imunossupressão por interferir no processo de apresentação de antígeno inibindo a expressão de moléculas MHC classe II, inibir a produção de IL-2 e reduzir a ativação mediada pelo receptor de IL-2 em linfócitos T, além de reduzir a secreção de IFN- $\gamma$  e a linfoproliferação (MICHELIN; SILVA; CUNHA, 2005; 2002). As PGs são também capazes de induzir mudança de classe de Ig em linfócitos B, levando preferencialmente à produção de IgE e IgG1 e de inibir a resposta do tipo Th<sub>1</sub>, atuando sobre Th<sub>0</sub>, para a expressão de citocinas com padrão Th<sub>2</sub> (SILVA *et al.*, 1995; GOLDEN; TARLETON, 1991; HARRIS *et al.*, 2002).

#### 1.4 Aspectos morfológicos

Aproximadamente 90% dos pacientes sobrevivem à fase aguda. A forma anátomo-clínica da doença são dadas pela intensidade da parasitemia e da resposta inflamatória (ABEL; KALIL; CUNHA-NETO, 1997; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007).

Pacientes acometidos pela Doença de Chagas apresentando miocardite apresentam macroscopicamente aumento da área cardíaca com uma distensão e congestão do saco pericárdico com maior quantidade de líquido claro e transparente, resultando da intensa inflamação que acomete os três folhetos cardíacos, principalmente o miocárdio. O epicárdio pode apresentar espessamento brancacentos, nodulares, ao longo dos ramos coronarianos, caracterizando uma pericardite produtiva. Esta lesão pericardite é mais comum na fase crônica, podendo acontecer na fase aguda. Geralmente o endocárdio tem aspecto normal e, raramente, pode ocorrer trombose intracavitária. (AÑEZ, *et al.*, 1999; ANDRADE, *et al.*, 2002; BENVENUTI; GUTIERREZ, 2007).

Na microscopia, a lesão inflamatória acomete os três folhetos cardíacos simultaneamente, com uma verdadeira pancardite. Não ocorrem apenas a congestão e o edema, mas verifica-se predomínio de intenso infiltrado de mononucleares (macrófagos, linfócitos, linfoblastos e plasmócitos) e quantidade variável de mastócitos e granulócitos, inclusive eosinófilos. O infiltrado penetra no endomíscio, sobrepondo ao longo dele ou

formando acúmulos, mascarando as fibrocélulas, dissociando-as e separando-as dos capilares, estendendo-se ao perímio e à adventícia dos vasos. Na fase aguda há um parasitismo intenso principalmente nas células musculares, visualizando os ninhos de amastigotas. Podendo parasitar outras células como macrófagos subepicárdicos e intramusculares, as células de Schwann dos gânglios e outras, porém não se encontram ninhos típicos, visualizando no máximo alguns parasitas (AÑEZ *et al.*, 1999; LOPES, *et al.*, 2006; BILATE; CUNHA-NETO, 2008).

Principalmente nas células musculares cardíacas é que se cumpre o ciclo do parasita, onde se inicia a inflamação caracteristicamente intrafascicular. Aparecendo a reação inflamatória somente em torno das fibras parasitadas rotas, as miocélulas parasitadas em geral não degeneram, sendo destruída somente uma parte. Ao se romperem as formas amastigotas e os demais elementos caem no interstício, desencadeando o processo inflamatório (ANDRADE, 1996).

As fibras musculares não parasitadas mostram várias lesões, desorganização e destruição dos sarcômeros, lise ou dissociação das microfibrilas. Ocorre ainda hipotrofia e necrose com esfacelo de grande número de fibras. Apesar da gravidade do processo inflamatório e dos fenômenos destrutivos que o acompanham, a fibrose não existe ou é discreta durante a fase aguda (AÑEZ, *et al.*, 1999; ANDRADE, *et al.*, 2002).

Observa-se uma epicardite aguda variável, ora focal, ora difusa, atingindo especialmente o tecido gorduroso e as estruturas nervosas, podendo acarretar ganglionite, periganglionite e neurite agudas. Também o endocárdio parietal mostra discreta inflamação aguda, focal ou difusa. Os linfonodos intrapericárdicos, situados entre a aorta e o tronco pulmonar mostram quadro de depleção linfocítica, porém não há relatos de parasitismo (AÑEZ, *et al.*, 1999).

A cardiopatia chagásica crônica, cujo substrato morfológico é uma inflamação crônica progressiva e fibrosante, pode ser assintomática ou apresentar-se como uma síndrome congestiva e/ou alterações do ritmo cardíaco e da condução do estímulo elétrico.

Macroscopicamente o epicárdio quase sempre apresenta espessamentos brancos, sob a forma de placas, faixas ou estrias, apresentando pequenos nódulos disseminados na superfície atrioventricular ou ao longo dos ramos coronários. Microscopicamente o quadro histológico geral é uma inflamação crônica fibrosante do tecido gorduroso subepicárdico. Além dos espessamentos, pode apresentar epicardite fibrinosa. Uma miocardite crônica fibrosante que se mantém em atividade pela eclosão

de repetidos focos inflamatórios, os quais confluem, confere à lesão um aspecto zonal ou difuso. Os focos inflamatórios predominando intrafasciculares ou endomissiais, estendem-se geralmente ao conjuntivo interfascicular ou à adventícia dos vasos de pequeno e médio calibre (ANDRADE, 1996; ANDRADE *et al.*, 2006; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007; BILATE; CUNHA-NETO, 2008).

Os processos degenerativos variam de intensidade nas diversas áreas miocárdicas. Atingem fibras contidas nos focos inflamatórios ou encerradas nas áreas de fibrose. Em fase mais avançadas do processo, grupos de miofibrilas desaparecem em meio ao infiltrado celular, e restos celulares são observados no interior dos macrófagos. Em outras áreas, focos inflamatórios são menos destrutivos, o infiltrado diminui ou desaparece, permanecendo íntegra a estrutura do sarcolema e do endomísio (ANDRADE, 1999).

Com a diminuição ou desaparecimento do infiltrado surge neoformação conjuntiva a partir do endomísio, a qual substitui as fibras cardíacas destruídas. Associado a esta, ocorre colapso da trama reticular miocárdica. O colágeno neoformado afasta e circunda as demais fibrocélulas que se atrofiam e desaparecem. Nas zonas de fibrose, o colágeno é dos tipos I e III. A fibrose pode atingir e envolver o perímio e unir-se a fibras de outros fascículos adjacentes, que se tornam não só interrompidos, mas também fixados uns aos outros pelo conjuntivo esclerótico neoformado (ANDRADE, 1999; LOPES, *et al.*, 2006).

### **1.5 Justificativa:**

Revisando a literatura, nos deparamos com uma escassez de estudos focados na pesquisa do *Trypanosoma cruzi* na fase aguda entre machos e fêmeas.

Tendo em vista, ainda, os dados controversos apresentados na literatura em relação à predominância das células inflamatórias, como sendo causa ou consequência da destruição tecidual e por não haver estudos comparando o infiltrado inflamatório, fibrose e o parasitismo na miocardite aguda, nos propusemos a realizar este estudo.

Nosso intuito foi pesquisar diretamente o parasita nos tecido cardíaco, a fim de averiguar se a intensidade do parasitismo era diferente entre machos e fêmeas. Além disso, realizamos estudo semiquantitativo e qualitativo do infiltrado inflamatório, com a finalidade de verificar se há semelhança no padrão inflamatório nos casos com e sem parasitismo evidente no órgão.

## **2. OBJETIVOS:**

- Geral:

Comparar o infiltrado inflamatório, dosagem de Óxido Nítrico e parasitismo entre camundongos BALB/C machos e fêmeas infectados com *T. cruzi* na fase aguda.

- Específicos:

1. Avaliar a presença de *T. cruzi* no miocárdio de camundongos machos e fêmeas.
2. Comparar o parasitismo no tecido cardíaco entre camundongos machos ou fêmeas.
3. Analisar se a intensidade do processo inflamatório tem relação com o parasitismo.
4. Verificar se, do ponto de vista quantitativo o infiltrado inflamatório é semelhante nos camundongos de ambos os sexos.
5. Avaliar se animais tratados com droga inibora da COX-2 têm diferença no infiltrado inflamatório, dosagem de NO e parasitismo.
6. Comparar se em animais tratados com droga inibidora da COX-2 há diferença entre os sexos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Infecção e tratamento dos animais

Foram utilizados 24 camundongos da linhagem BALB/C, sendo 12 machos e 12 fêmeas, jovens, com idade aproximada de doze semanas, pesando entre 20 e 30g, mantidos em 6 grupos. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, com renovação constante do ar, à temperatura de 20 a 26 °C, alimentação baseada em ração comercial de composição conhecida e com livre acesso à água.

Para produzir a infecção chagásica, foi utilizada a cepa “Y”, utilizando tripomastigotas sanguíneas provenientes de camundongos Swiss infectados, obtidos por sangria do plexo venoso oftálmico (WAYNFORTH; FLECKENLL, 1992) em citrato de sódio a 3,8%. O inóculo foi ajustado para a concentração de  $3 \times 10^2$  tripomastigotas sanguínea administrado por via intraperitoneal.

Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo 3 machos e 3 fêmeas, cada grupo contendo 4 animais. E apenas 4 grupos foram infectados. Posteriormente, foram tratados conforme protocolo descrito abaixo (tabela 1). Como grupo-controle foram utilizados animais não-infectados da mesma linhagem, sexo, idade e peso.

Logo após a infecção, os animais foram tratados com PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4) e Etoricoxib, diariamente por via subcutânea.

Tabela 1 – Esquema de tratamento dos animais infectados ou não-infectados.

<b>Grupo</b>	<b>Infecção</b>	<b>Tratamento</b>
1 – Controle Macho	( - )	PBS
2 - Controle Fêmea	( - )	PBS
3 - Infectado sem tratamento Macho	( + )	PBS
4 - Infectado sem tratamento Fêmea	( + )	PBS
5 - Infectado com tratamento Macho	( + )	Etoricoxib 0,6 mg/Kg por dia
6- Infectado com tratamento Fêmea	( + )	Etoricoxib 0,6 mg/Kg por dia

### 3.2 – Parasitemia

A parasitemia dos grupos experimentais infectados com cepa Y do *Trypanosoma cruzi* foi determinada utilizando 5 µl de sangue de veia caudal de cada animal (MELO; BRENER, 1978), a partir do 5º dia após a infecção até o 19º, fazendo uso de microscópio de luz comum, para contagem em 50 campos consecutivos da lâmina.

Após uma infecção de 21 dias, foi realizada a eutanásia e os animais tiveram seus corações coletados, para análise morfométrica para determinação do infiltrado inflamatório, quantificação nos ninhos de amastigotas e avaliação da fibrose, bem como o baço e o lavado peritoneal para determinação do NO. Durante o dia os animais foram supervisionados para a verificação de eventuais mortalidades.

### 3.3 – Estudo anatomopatológico:

Os animais no 21º dia foram eutanasiados, submetidos à ectoscopia e à incisão mento-pubiana com subsequente abertura das cavidades torácica e abdominal. Em seguida, tiveram retirados os corações, que foram seccionados transversalmente ao eixo maior tomando como referência a base do ventrículo. Para o processamento, foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, após terem sido lavados em soro fisiológico. Depois de um período mínimo de fixação por 8 horas, todo o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina, para o estudo histopatológico (PROPHET *et al.*, 1992).

Para o estudo microscópico, os blocos de parafina foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes seriados com 5 µm de espessura confeccionados em 4 lâminas.

Das quatro lâminas de cada bloco, contendo cada duas seções do material, foram realizados métodos de coloração específica, ficando uma lâmina de reserva.

Uma seção de cada bloco dos corações foi corada com hematoxilina-eosina (PROPHET *et al.*, 1992) para avaliar o infiltrado inflamatório. (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando entelan.

#### 3.3.1 – Infiltrado Inflamatório

Para análise qualitativa do infiltrado, foi definido grau de miocardite, sendo

utilizados os dois cortes histológicos de cada lâmina corados segundo a técnica de HE. A miocardite foi caracterizada por infiltrado celular dos miocardiócitos. Com base na intensidade do exsudato, foi classificada em leve (raros e pequenos focos), moderada (focos esparsos de tamanho médio) e intensa (focos freqüentes e extensos) e ausência de inflamação quando não apresentava células do infiltrado inflamatório ou miocardite.

A contagem do infiltrado inflamatório foi feita nos cortes corados por Hematoxilina-Eosina, utilizando um microscópio de luz, acoplado a uma câmera de vídeo que enviava a imagem para um monitor de alta resolução. A imagem obtida no monitor era integrada a um cursor, conectada a um sistema analisador de imagens. A contagem era feita manualmente, padronizando-se, porém, desta forma a área que estava sendo analisada. Foi realizada a contagem do infiltrado inflamatório em 30 campos seqüenciais microscópico de luz comum, com ocular de 10x e objetiva de 40x (aumento de 400x), perfazendo uma área de 19 mm<sup>2</sup>.

Após a análise qualitativa e quantitativa foram identificados como ausência de inflamação os casos em que não se verificou presença de células do infiltrado inflamatório ou miocardite. E quando apresentou células inflamatórias no parênquima cardíaco, utilizando um microscópio de luz acoplado a uma câmera de vídeo, capturava a imagem com o programa Nis Elements, que era projetada no monitor através de um processamento com placa de captura. Utilizando uma objetiva de 40x com aumento final de 400x, a contagem do infiltrado inflamatório foi feita com o uso do software Image J v. 1.32 (Wayne Rasbande National Institutes of Health, USA).

Este procedimento compreendeu os seguintes passos: File – Open, selecionou-se a imagem a ser analisada – Pluggins – Particle Counting. A seguir clicou-se em *grid* e selecionaram-se as seguintes opções: *Grid Type* (Crosses); *ÁREA per point* (3000 *pixels*<sup>2</sup>); *Line Width* (2 *pixels*); *ok*. No campo foram distribuídas 108 cruces sobre a imagem a ser analisada. Clicou-se em *Pluggins*, selecionou-se *Particle Counting – Cell Counter*, iniciando-se a contagem das células que coincidiram com as cruces. O número de infiltrado era anotado em cada campo e, ao final, obtinha-se a soma total do número em 30 campos. O resultado foi expresso em porcentagem de leucócitos por campo (% leucócitos/campo).

#### 3.4 – Obtenção, cultura das células e coleta dos sobrenadantes e posterior dosagem do NO

Os animais dos grupos experimentais no 21º dia de infecção sofreram eutanásia.

Foi realizado lavado peritoneal com RPMI incompleto e após recolhido o lavado. Foi removida uma porção do baço para coleta de células esplênicas também para cultura celular para, desta forma, determinar a concentração de NO esplênico e peritoneal.

Após a homogenização e lavagem das células esplênicas e do lavado peritoneal por centrifugação com RPMI 1640 completo, estes foram contados e suspensos em RPMI completo.

Sendo distribuídas em placas de 48 orifícios de fundo plano em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/orifícios em triplicada em um volume de 1,0 ml e estimuladas com LPS a uma concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  e um orifício permaneceu sem estímulo. Após 24 horas de incubação com o estímulo e a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes, obtidos foram aliqüotados e armazenados a 70°C para posteriores dosagens.

### 3.5 – Determinação da concentração de óxido nítrico

A produção de NO foi determinada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN; SCHAEFER, 1981). Às amostras foram adicionados os mesmos volume de reagentes de Griess, que continham NEED 0,1% e sulfanilamida 1% diluída em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%. A reação foi lida em leitor de ELISA utilizando filtro de 540 nm. A curva padrão variou de 0,39 a 200  $\mu\text{M}$  de nitrito de sódio.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 – Parasitemia

A partir do 5º dia após infecção, até o 19º dia, foi realizada a parasitemia dos diferentes grupos experimentais como descrito em Materiais e Métodos, e pudemos observar que o pico de parasitemia ocorreu entre o 7º e 10º dias de infecção.

O grupo experimental que recebeu PBS apresentou um pico de parasitemia maior que os demais grupos experimentais tratados com Etoricoxib (inibidora da COX-2), o que mostrou que o grupo experimental tratado apresentou uma maior redução da parasitemia comparativamente ao grupo tratado com PBS. Entretanto não se observou diferença entre os sexos, tanto camundongos machos como fêmeas tiveram o mesmo comportamento.

No gráfico 1, podemos verificar os níveis de parasitemia dos grupos experimentais, tratados ou não com inibidores da COX-2.

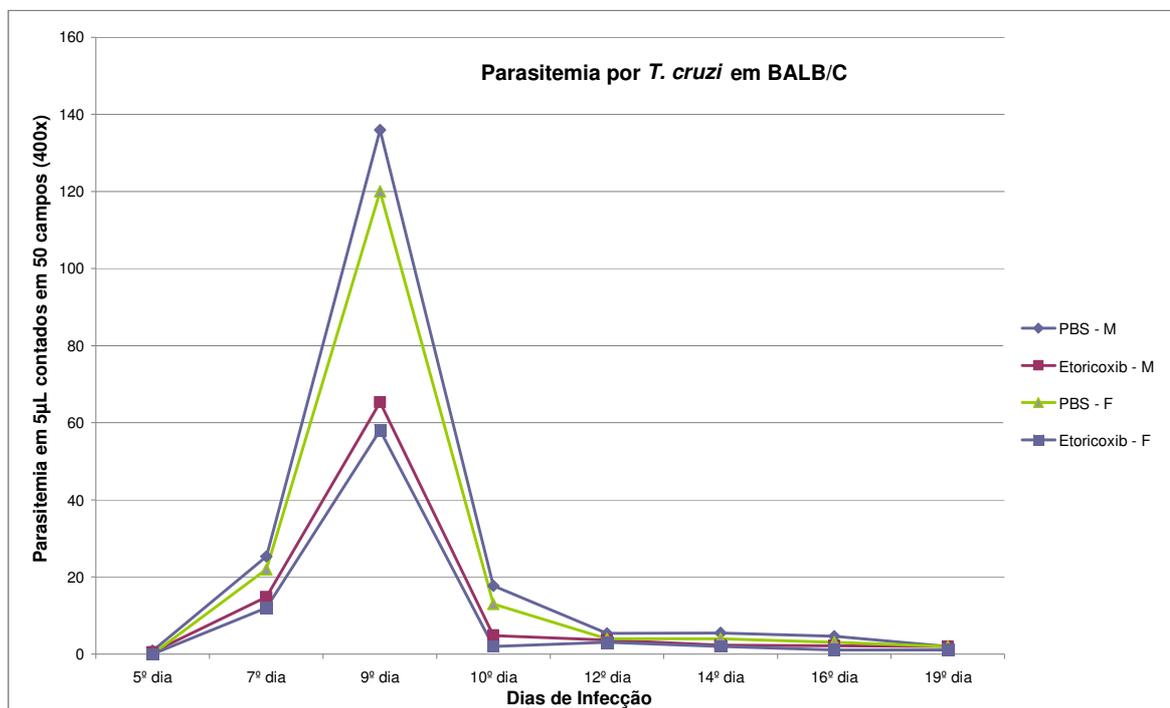


Gráfico 1: Parasitemia dos animais experimentais tratados ou não com Etoricoxib (inibidora da COX-2) durante o 5º e 19º dias de infecção com 300 formas de *Trypanosoma cruzi*.

#### 4.2 – Sobrevida dos grupos experimentais:

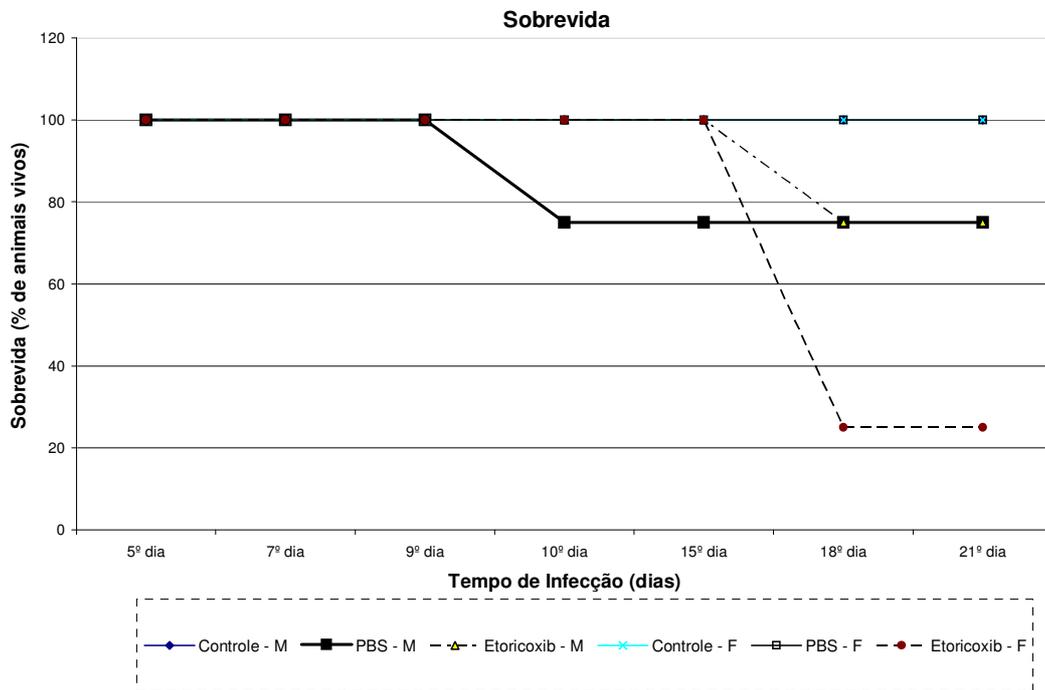


Gráfico 2: Curva de sobrevida dos camundongos BALB/c infectados tratados e não-tratados com inibidor da ciclooxigenase (Etoricoxib) durante 21 dias após a infecção com 300 formas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Durante os 21 dias de infecção, ocorreram cinco mortes dentro dos grupos experimentais, acontecendo uma morte no 10º dia de infecção no grupo macho infectado tratado com PBS; uma, no grupo macho tratado com Etori no 18º dia, e 3 no grupo experimental de fêmeas tratado com Etori no período do 18º ao 20º dia de infecção. O gráfico 2 demonstra a curva de sobrevida durante o período de 21 dias de infecção.

#### 4.3 – Estudo histopatológico do parênquima cardíaco – Infiltrado Inflamatório

A avaliação preliminar global dos cortes corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina permitiu observar os infiltrados inflamatórios. No grupo-controle não se identificou infiltrado inflamatório; já os grupos infectados apresentaram alta parasitemia tecidual, com destruição das fibras musculares, ninhos de amastigotas íntegros, como ninhos rotas, nos quais podem-se visualizar os parasitas.

#### 4.3.1 – Avaliação Qualitativa da presença de Miocardite

Para análise qualitativa do infiltrado foi definido grau de miocardite nas lâminas coradas com HE (como descrito na metodologia). A miocardite foi caracterizada por infiltrado celular dos miocardiócitos. Com base na intensidade do exsudato, foi classificada em leve (raros e pequenos focos), moderada (focos esparsos de tamanho médio) e intensa (focos freqüentes e extensos) e ausência de inflamação quando não apresentava células do infiltrado inflamatório ou miocardite. (Tabela 2 e figuras 1 ao 6)

Tabela 2 – Avaliação Qualitativa da Miocardite nos grupos experimentais.

<b>Grupo</b>	<b>Infecção</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Classificação Miocardite</b>
1 – Controle Macho	( - )	PBS	Ausência
2 - Controle Fêmea	( - )	PBS	Ausência
3 - Infectado sem tratamento Macho	( + )	PBS	Intensa
4 - Infectado sem tratamento Fêmea	( + )	PBS	Intensa
5 - Infectado com tratamento Macho	( + )	Etoricoxib	Intensa
6- Infectado com tratamento Fêmea	( + )	Etoricoxib	Intensa

Verificou-se grande infiltrado inflamatórios nos grupos infectados tratados ou não com inibidores da COX, porém qualitativamente não se pode afirmar qual teria mais infiltrado, visto que ambos apresentavam miocardite e uma grande quantidade de parasitemia tecidual.

Diante disso, houve a necessidade de quantificar o infiltrado inflamatório.

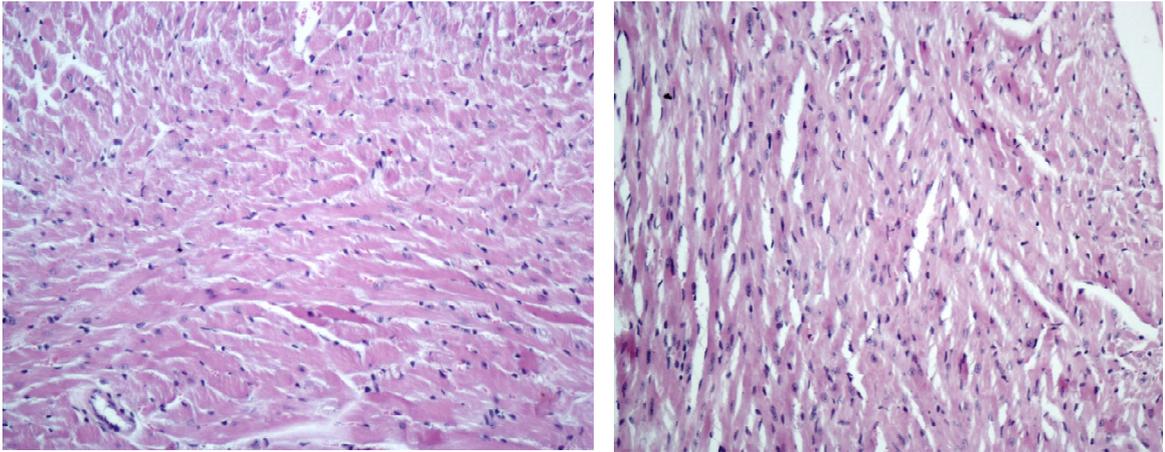


Figura 1 e 2 – Miocárdio do grupo-controle Macho e Controle Fêmea corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.

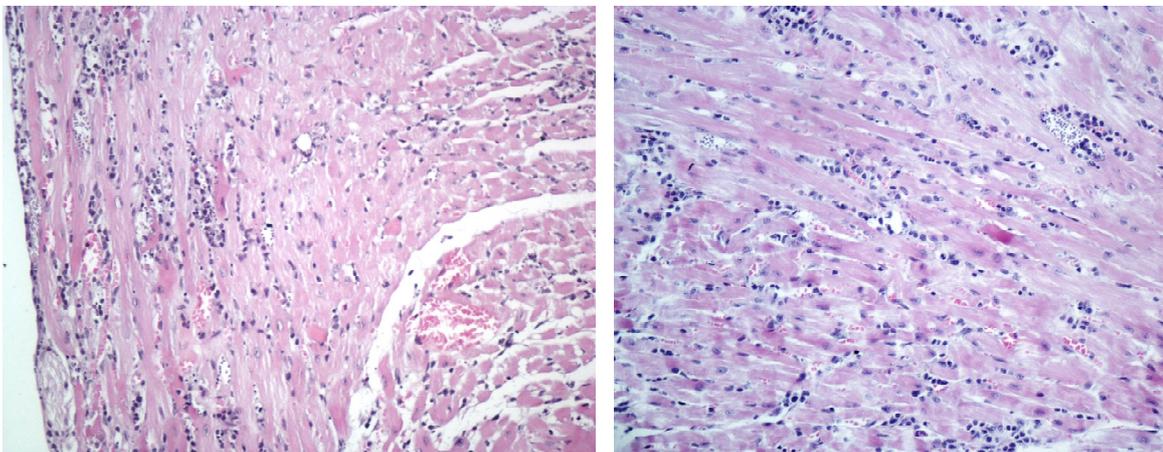


Figura 3 e 4 – Miocárdio do grupo Infectado Tratado com PBS Macho e Fêmea corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.

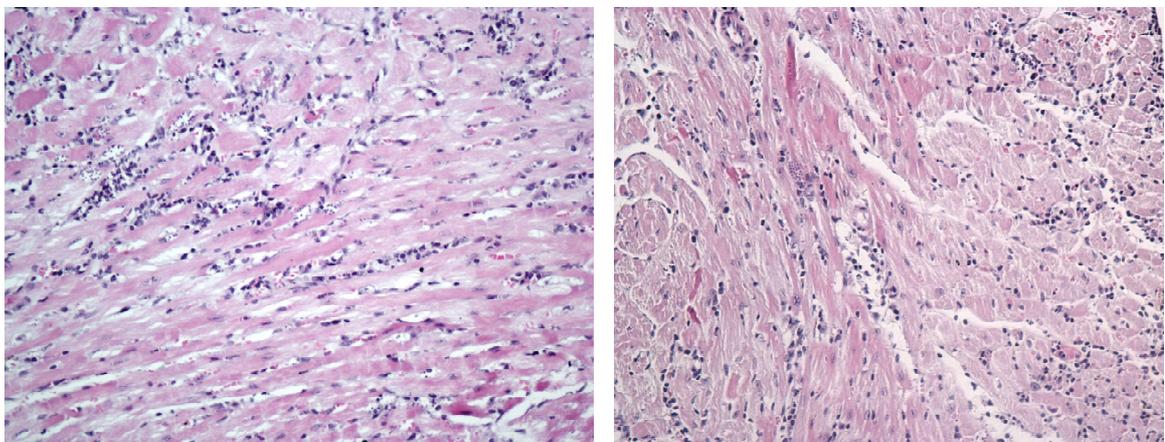


Figura 5 e 6 – Miocárdio do grupo Infectado Tratado com Etoricoxib Macho e Fêmea corado por Hematoxilina-Eosina, objetiva com aumento de 200x.

A análise do infiltrado inflamatório procedeu-se como descrito na Metodologia. Através da tabela 3, podemos observar os diferentes valores encontrados da percentagem de leucócitos por campo analisados para cada animal presente no estudo, além do grupo experimental pertencente, expresso em mediana, mínimo e máximo, uma vez que os nossos dados apresentaram uma distribuição normal.

Tabela 3 – Valores médios do número de leucócitos na miocárdio, de acordo com os grupos de estudos analisados em 30 campos (19 mm<sup>2</sup>)

Grupo	Sexo	% Leucócitos/Campo			
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Controle 1</i>	Macho	1,70	1,0	0	6
<i>Controle 2</i>	Macho	1,20	1,0	0	3
<i>Controle 3</i>	Macho	1,53	1,0	0	5
<i>Controle 4</i>	Macho	1,36	1,0	0	3
<i>Controle 1</i>	Fêmea	2,00	1,0	0	6
<i>Controle 2</i>	Fêmea	1,40	1,0	0	4
<i>Controle 3</i>	Fêmea	1,40	1,0	0	6
<i>Controle 4</i>	Fêmea	1,37	1,0	0	3
<i>PBS 1</i>	Macho	56,06	56,5	26	91
<i>PBS 2</i>	Macho	61,80	62,0	88	31
<i>PBS 3</i>	Macho	58,86	54,0	22	133
<i>PBS 1</i>	Fêmea	62,60	56,5	24	136
<i>PBS 2</i>	Fêmea	85,70	79,0	38	162
<i>PBS 3</i>	Fêmea	70,63	66,5	30	141
<i>PBS 4</i>	Fêmea	77,40	76,5	42	138
<i>Etoricoxib 1</i>	Macho	28,76	26,5	9	60
<i>Etoricoxib 2</i>	Macho	41,83	39,5	23	86
<i>Etoricoxib 3</i>	Macho	45,43	43,0	17	83
<i>Etoricoxib 1</i>	Fêmea	54,16	46,5	19	103

Através desta tabela 3, é possível perceber que os animais pertencentes ao controle (sem infecção), apresentaram uma quantidade inferior de leucócitos em relação aos demais grupos experimentais, não apresentando infiltrado. O grupo de fêmea 2 infectada tratada

com PBS foi o que apresentou o maior percentual de leucócitos por campo neste estudo. Também podemos observar que os grupos infectados tratados com PBS apresentaram maior número de infiltrados por campo comparado com o grupo utilizando Etoricoxib, sem significância estatística, descrito na tabela 3 e 4 e no gráfico 3.

Tabela 4 – Porcentagem de leucócitos por campo nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Sexo	Amostra	% Leucócitos/Campo		
			Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	Macho	4	1,44	1,2	1,7
Controle	Fêmea	4	1,4	1,37	2,0
PBS	Macho	3	58,86	56,06	61,80
PBS	Fêmea	4	74,01	62,6	85,7
Etori	Macho	3	41,83	28,76	45,43
Etori	Fêmea	1	54,6	54,6	54,6

Como se observa no gráfico 3, houve diferença entre os grupos controle Macho com camundongos infectados Fêmea e o grupo-controle fêmea com grupo infectado tratado com PBS fêmea, entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos não infectados com os tratados com PBS ou Etori nos demais grupos.

### Quantificação do Infiltrado Inflamatório

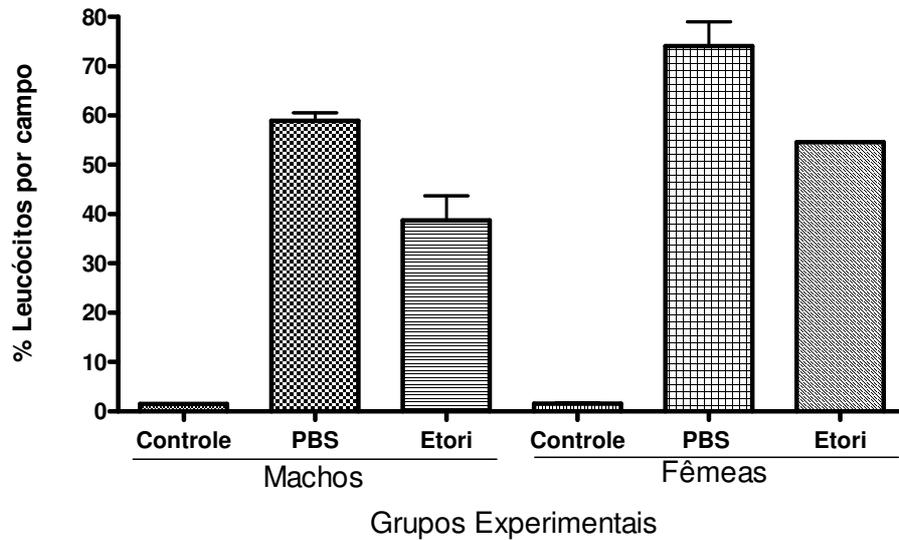


Gráfico 3: Comparação da porcentagem de leucócitos por campo entre os diferentes grupos experimentais durante 21 dias de infecção com 300 formas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y.

#### 4.4 Dosagem de Óxido Nítrico

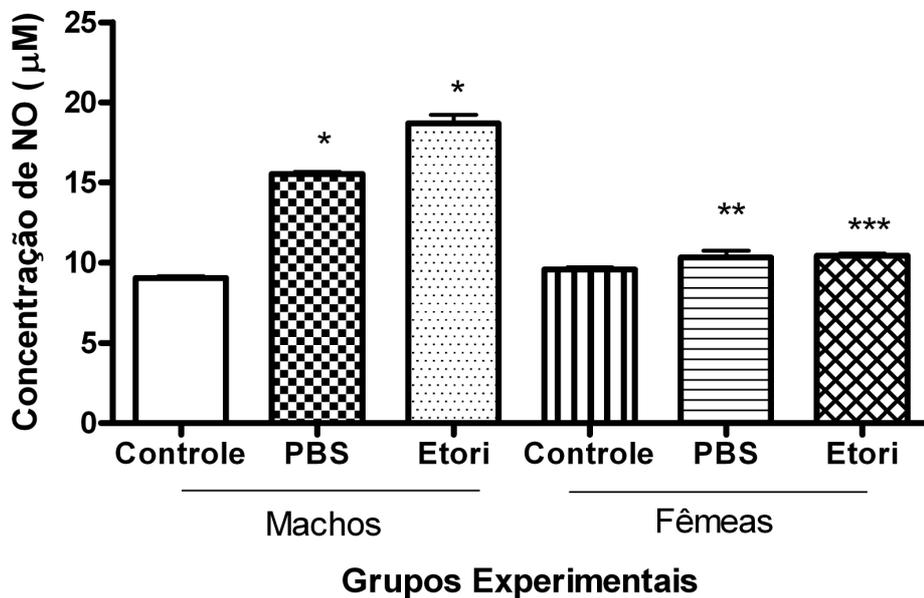


Gráfico 4: Níveis de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de *Trypanosoma cruzi*. Sem estímulo com LPS

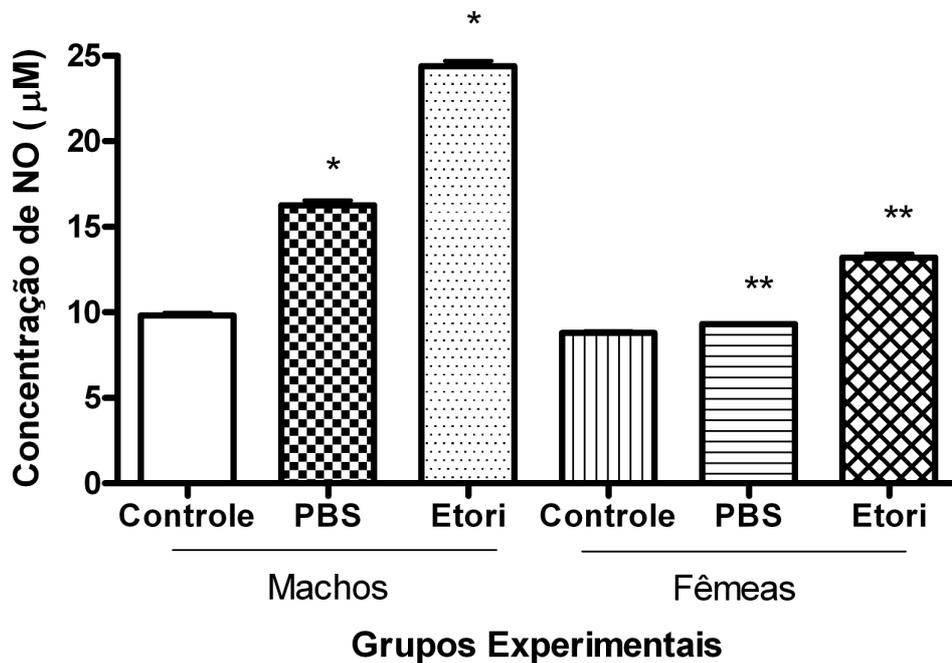


Gráfico 5: Níveis de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de *Trypanosoma cruzi* estimulado com LPS

Analisando as dosagens de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos, observa-se que não houve diferença entre os controles machos e fêmeas, mas após a infecção, os camundongos machos produziram maiores concentrações de NO principalmente quando tratados com Etori, diferente dos camundongos fêmeas em que não houve produção de NO após a infecção, mas quando estimulados com LPS o grupo tratado com Etori respondeu tanto em machos como em fêmeas.

Em relação às culturas de células esplênicas em relação ao NO (Gráficos 6 e 7), verifica-se que não houve diferença na produção quando comparados os grupos controles com os infectados, como também não houve diferença entre camundongos machos e fêmeas. E mesmo após o estímulo com LPS não obteve diferenças entre os grupos.

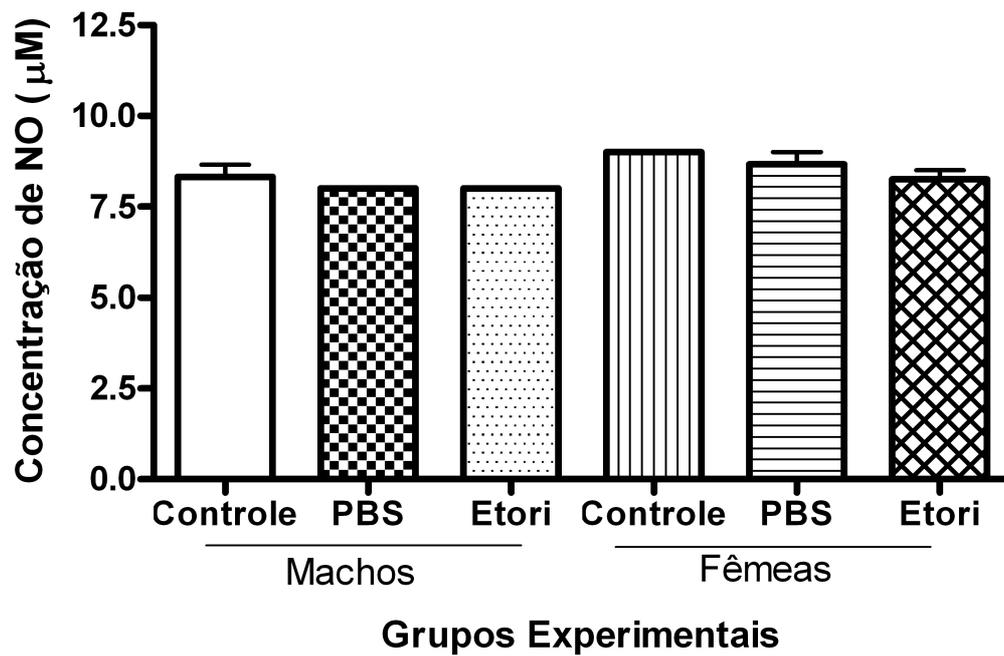


Gráfico 6: Níveis de óxido nítrico em cultura de células esplênicas dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de *Trypanosoma cruzi*. Sem estímulo com LPS

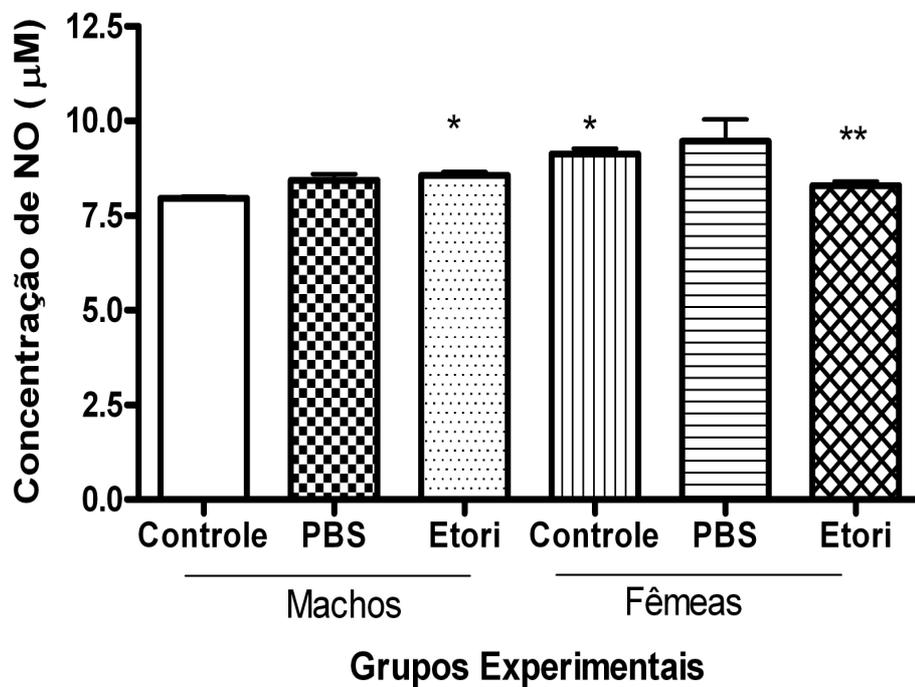


Gráfico 7: Níveis de óxido nítrico em cultura de células esplênicas dos camundongos BALB/c macho e fêmea infectados com 300 formas de *Trypanosoma cruzi* estimulada com LPS

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo procurou comparar a parasitemia, a dosagem de óxido nítrico e o infiltrado inflamatório entre camundongos machos e fêmeas durante a fase aguda da Doença de Chagas em camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, utilizando um inibidor da COX-2.

O sistema imune utiliza mecanismos essenciais para o controle da replicação parasitária, bem como a resistência do hospedeiro à infecção durante os primeiros dias após o inóculo com *T. cruzi*, sendo que a indução ou inibição da produção de certas citocinas tem um papel importante na patologia desta doença (ALCAIDE; FRESNO, 2004; ANTÚNEZ; CARDONI, 2000; COSTA *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos experimentais buscam elucidar o papel do sistema imune na doença de Chagas observando-se a parasitemia e a curva de sobrevivência (SILVA *et al.*, 1995; HÖLSHER *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 1998; ABRAHAMSOHN; SILVA; COFFMAN, 2000; ANTÚNEZ; CARDONI, 2000; GOÑI; ALCAIDE; FRESNO, 2002; TARLETON, 2004; ARANTES *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2006; ALMEIDA-LEITE *et al.*, 2007).

Neste estudo, os dados da parasitemia e da curva de sobrevivência dos camundongos dos grupos experimentais infectados tanto machos quanto fêmeas, tratados ou não com Etoricox, estão de acordo com a literatura, demonstrando que há menor parasitemia no grupo tratado com Etoricoxib, em relação ao grupo infectado com PBS. Estes dados estão de acordo com estudos realizados por Abdalla e colaboradores (2007).

Os animais que receberam a droga inibidora da COX-2 apresentaram um pico de parasitemia menor, não observando diferença em relação ao sexo. Dessa forma, acredita-se que o Etoricoxib possa ter atuado sobre o sistema imune, inibindo a síntese de PGE<sub>2</sub> e favorecendo uma resposta imune de padrão Th<sub>1</sub>, como ocorre em outros trabalhos encontrados na literatura. (REIS, *et al.*, 1997; LIMA, *et al.*, 2001; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002; UNE; ANDERSON; ÖRN, 2003)

Há estudos que apresentam o balanço da resposta imune de acordo com o padrão Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, como trabalho realizado por Antúnez e Cardoni (2000, 2001) no qual empregando diferentes linhagens de camundongos, demonstram que os níveis de parasita diminuíram quando comparados ao aumento da produção de citocinas do padrão Th<sub>1</sub>, demonstrando esse padrão estar diretamente relacionada à resistência a infecção.

Com a finalidade de poder comprovar ou não a participação de determinada

citocina na resposta imune ao parasita e na indução de células e/ou citocinas, tem-se empregado camundongos KO para determinada citocina, como no estudo de Une, Anderson e Örn (2003) que utilizaram camundongos C57B1/6 KO para IL-12 e para o receptor do IFN $\alpha/\beta$ . Observaram que a parasitemia dos animais KO foi muito maior que nos animais selvagens, demonstrando a importância destas citocinas na infecção chagásica, pois nos camundongos KO houve ausência de células T como produção diminuída de NO. Höhler e colaboradores (1998) demonstraram a importância do IFN- $\gamma$  e iNOS. Camundongos KO apresentavam maior susceptibilidade, com aumento da parasitemia e morte precoce dos animais, concluindo o quanto o IFN- $\gamma$  e NO são cruciais para a atividade tripanomicida dos macrófagos e sobrevivência dos camundongos na fase aguda da doença de Chagas (COSTA *et al.*, 2006).

Martins e colaboradores (1999) verificaram o papel do IFN- $\gamma$  na indução de apoptose e proteção do hospedeiro durante a infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*. Constataram que camundongos KO para IFN- $\gamma$  tinham um pico de parasitemia maior que os animais do grupo-controle, e morte precoce. Soares e colaboradores (2001), utilizando camundongos BALB/c KO para IL-4, observaram que estes apresentaram um pico de parasitemia menor que os selvagens, demonstrando que o papel das citocinas do padrão Th<sub>2</sub> poderiam atuar regulando o padrão da resposta Th<sub>1</sub>, que poderia ocasionar, em maiores proporções, uma lesão tecidual, mas também proteção ao parasita.

O pico de parasitemia ocorreu entre o 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias de infecção, em concordância com os achados da literatura (MARTINS *et al.*, 1999; ALIBERTI *et al.*, 2001). No entanto, há trabalhos nos quais os picos de parasitemia acabaram sendo mais tardios (SAEFTEL; FLEISCHER; HOERAUF, 2001; TALVANI *et al.*, 2000), possivelmente, pelo fato de a linhagem de camundongos ser diferente e também, a quantidade de inóculo administrado e o tipo de cepa não serem os mesmos.

A taxa de mortalidade foi de 20,8%, dados similares com a literatura na qual verificamos que há perda de pelo menos 20% do total dos animais em cada experimento na fase aguda da doença, mesmo utilizando inóculos iguais ou diferentes do nosso (SILVA *et al.*, 1995; HÖLSCHER *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 1999; TALVANI *et al.*, 2000; UNE; ANDERSON; ÖRN, 2003; ARANTES, 2004). A sobrevivência está relacionada ao tipo de cepa do *Trypanosoma cruzi* utilizada em cada experimento (DEVERA *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 1985), sendo a cepa Y uma cepa menos virulenta quando comparadas às cepas Colombiana e Tulahen. E, além disso, quanto à linhagem de camundongos utilizados

(ANDRADE *et al.*, 1985), animais KO são mais susceptíveis quando comparados aos selvagens. Neste estudo foram utilizados animais BALB/C, que são susceptíveis à infecção.

Tanto na área de imunologia como na morfologia, a miocardite chagásica experimental tem sido alvo de grandes estudos (ANDRADE *et al.*, 1985; ANDRADE, 1997; HÖLSCHER *et al.*, 1998; HIGUCHI, 1999; DOS SANTOS *et al.*, 2001; GIRONÉS *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2001. CHANDRA *et al.*, 2002; HIGUCHI *et al.*, 2003; PUNUKOLLU; GOWDA; KHAN, 2004; ANDRADE *et al.*, 2006; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007; BENEVENUTE; GUTIERREZ, 2007; BILATE; CUNHANETO, 2008). Grandes investigações têm focado a caracterização do infiltrado inflamatório, o papel das citocinas e mediadores inflamatórios tanto em modelos humanos como em experimentais (GORELIK *et al.*, 1992; REIS *et al.*, 1997; TARLETON;ZHANG, 1999; TALVANI *et al.*, 2000; ABEL *et al.*, 2001; ALIBERTI *et al.*, 2001, GOMES *et al.*, 2003; TALERTON, 2003; NUNES *et al.*, 2004).

Neste estudo observamos a presença de infiltrado inflamatório no parênquima cardíaco dos camundongos machos e fêmeas infectados com a cepa Y, classificando a miocardite de forma qualitativa, constatando que independente do grupo infectado tratado ou não e do sexo, todos tinham uma evidente miocardite, havendo necessidade de quantificar o infiltrado para comparação entre os grupos.

Os animais que receberam o tratamento com Etoricoxib apresentaram uma quantidade de infiltrado inflamatório significativamente menor comparado ao grupo que recebeu PBS. Essa observação foi confirmada tanto em camundongos machos como em fêmeas. Comparando os sexos, o grupo experimental feminino apresentou um aumento do infiltrado inflamatório tanto no PBS como nos tratados com Etoricoxib maior que nos grupos experimentais machos.

A provável explicação para o influxo de células mononucleares, principalmente macrófagos para o parênquima cardíaco durante a infecção experimental de fase aguda por *Trypanosoma cruzi* relatado na literatura, deve-se particularmente ao IFN- $\gamma$  secretado por linfócitos ou por células NK, que ativam a atividade parasiticida destes macrófagos, através de um mecanismo dependente de NO ou mesmo por produtos parasitários (MELO; MACHADO, 2001). Contudo, há relatos de que possa ocorrer também ação de moléculas de adesão expressas por células endoteliais cardíacas e quimiocinas (SANTOS *et al.*, 2001) e também a ação de citocinas, como IL-12, responsável pela estimulação de IFN- $\gamma$  (DA

SILVA; ABRAHAMSOHN, 2001).

Andrade e colaboradores (1985) avaliaram o comportamento de diferentes cepas do *T. cruzi* na infecção de diferentes linhagens, podendo observar que todos os grupos que continham animais mais susceptíveis apresentavam uma quantidade de infiltrado celular no tecido cardíaco maior e composto em sua maioria por células mononucleares.

Marinho e colaboradores (1999) observaram o parasitismo tecidual em fêmeas de camundongos A/J infectados com a cepa Y, observando que a quantidade de inóculo utilizado determinou o grau de miocardite naqueles animais e ainda puderam observar o predomínio de células do infiltrado inflamatório como sendo de células mononucleares, colaborando para veracidade de nossos dados durante este estudo.

Há estudos que, além de caracterizarem morfológicamente as células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais infectados por *T. cruzi*, também fizeram a diferenciação destas células. Talvani e colaboradores (2000) afirmaram em seus estudos que o domínio de células mononucleares era de linfócitos T CD4+ durante a fase inicial da doença. Sendo que, após o 42º dia de infecção, o predomínio foi de linfócitos T CD8+, sendo estes dados também encontrados por Dos Santos e colaboradores (2001).

Esses dados são importantes, pois de acordo com o estudo de Reis e colaboradores (1997), apresentaram uma correlação positiva entre células T CD8+ e a síntese de citocinas do padrão Th<sub>1</sub>, o que poderia explicar os maiores danos em pacientes cardíacos, do que naqueles na forma indeterminada da doença. Porém a recuperação da resposta imune de padrão Th<sub>1</sub> favoreceria a diminuição do infiltrado inflamatório nos animais de nosso estudo que receberam Etoricoxib, assim como o fato de estar relacionada com o controle do parasitismo tecidual (SOARES *et al.*, 2001; HIGUCHI *et al.*, 2003).

Como ocorre em outras infecções por microorganismos patogênicos intracelulares, a infecção pelo *T. cruzi* mobiliza mecanismos de imunoproteção (BENEVENUTI; GUTIERREZ, 2007; BILATE; CUNHA-NETO, 2008). A inflamação no presente estudo foi encontrada em 100% dos casos, sendo que, na fase aguda, detectou-se um predomínio de polimorfonucleares. Em modelo experimental, estudos revelam um papel preponderante para linfócitos CD4+, tanto na imunidade como na patogenia (DOS SANTOS *et al.*, 2001). A caracterização do infiltrado inflamatório da miocardite chagásica crônica humana pode oferecer informações relevantes para o esclarecimento da patogênese terapêutica e prognóstico da doença de Chagas. Estudos mostram que este infiltrado inflamatório é constituído predominantemente de linfócitos e macrófagos, ao lado de menor número de

eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos (ANDRADE, 1958; LOPES *et al.*, 2006).

Na doença de Chagas, sabe-se que o fator lesivo inicial é o parasitismo de miocardiócitos pelo *T. cruzi*. Em nossos resultados, o número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco nos animais infectados com a cepa Y foi observado com frequência nos dois grupos infectados independente do tratamento, não sendo possível compararmos estatisticamente o fato em relação ao sexo.

Contribui com os dados encontrados, o trabalho de Andrade e colaboradores (1997), que trataram camundongos swiss, infectados com quatro tipos diferentes de cepa do *Trypanosoma cruzi* (Y, Peruvian, Colombiana e 21SF), com diferentes drogas imunossupressoras, observando que os animais que receberam o tratamento, independente da cepa utilizada, apresentaram maior parasitemia, infiltrado inflamatório no tecido cardíaco e morte, que aqueles que não utilizaram aquelas drogas, sendo o mecanismo proposto o de que estas drogas diminuam a síntese de citocinas do padrão Th<sub>1</sub>, como IL-1, IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Contrariando, Chandra e colaboradores (2002) verificaram que a quantidade de infiltrado celular, bem como lesão do tecido cardíaco em camundongos C57B1/6 deficientes para o gene NOS2 e infectados com a cepa Tulahuen, foi menor comparativamente aos animais selvagens, o que, segundo eles, poderia ser causado por uma expressão aumentada do gene NOS2, induzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ .

Estudo realizado por Gomes e colaboradores (2003) em pacientes na fase crônica da doença de Chagas na forma indeterminada e na forma cardíaca estabeleceu um balanço entre as citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ , estando os níveis de IL-10 maiores em indivíduos na forma indeterminada e IFN- $\gamma$  aumentados em indivíduos na forma cardíaca. Este trabalho demonstrou que o IFN- $\gamma$  tanto pode ser benéfico por proteger o hospedeiro contra o parasita, quanto pode contribuir para o agravamento dos danos cardíacos.

A fibrose representa um dos mais importantes achados que compromete a função contrátil cardíaca durante a fase crônica da infecção. Acredita-se que seu desenvolvimento ocorra por substituição do tecido lesado, cumprindo a função de preenchimento. Na doença de Chagas, representa uma perda da massa contrátil, além de contribuir para a desorganização das miocélulas estando assim associado à insuficiência cardíaca congestiva (LOPES; CHAPADEIRO, 1997).

Com a evolução da inflamação, células presentes no tecido conjuntivo, como

fibroblasto, começam a sintetizar colágeno para substituir o tecido lesado, formando, assim, a fibrose. A fase aguda da infecção é caracterizada por alguns autores por não apresentar fibrose, ou a mesma ser cicatricial (LOPES *et al*, 1981). No nosso estudo, por ter apenas 21 dias, não verificamos fibrose; apenas um intenso infiltrado inflamatório. Acreditamos que a fibrose de substituição representaria uma seqüela de miocardite.

O Trabalho de Abdalla e colaboradores (2007) avaliando o papel da PGE<sub>2</sub> nas lesões cardíacas durante a infecção pelo *T. cruzi* verificou que os animais do grupo experimental infectado tratado com PBS apresentaram uma maior concentração de PGE<sub>2</sub> que os animais que receberam tratamento. Estes animais também apresentaram maior quantidade de infiltrado inflamatório, fibrose e parasitemia significativamente maiores, o que poderia ser explicado por estes animais apresentarem um estado de imunossupressão conferido pela PGE<sub>2</sub>. Esta apareceria modulando a resposta imune destes animais, diminuindo a síntese de citocinas de padrão Th<sub>1</sub> (BORGES *et al*, 1998; PINGE FILHO *et al*, 1999), inibindo a capacidade de linfoproliferação, através da inibição de ciclinas (SHENG *et al*, 1997) e também a síntese de IgM por linfócitos B. A PGE<sub>2</sub>, porém, favoreceria um aumento das citocinas de padrão Th<sub>2</sub>, que poderia levar a produção de IgG1 e IgE por células B que ocasionaria um aumento das lesões teciduais, já que possibilitaria um ambiente favorável para o crescimento do parasita (PHIPPS *et al*, 1991; ROPPER; PHIPPS, 1994; CELENTANO *et al*, 1995).

Outros experimentos na fase aguda corroboram com este estudo ao demonstrarem que PGE<sub>2</sub> produz imunossupressão no processo de apresentação de antígeno inibindo a expressão de moléculas MHC classe II, inibindo a produção de IL-2 e reduzindo a ativação mediada pelo receptor de IL-2 em linfócitos T, além de reduzir a secreção de IFN- $\gamma$  e a linfoproliferação (CELENTANO, *et al*, 1995; ANDRADE, *et al*, 1997; BORGES, *et al*, 1998; GOÑI; ALCALAIDE; FRESNO, 2002). As PG são também capazes de induzir mudança de classe Ig em linfócitos B, levando preferencialmente à produção de IgE e IgG1, e de inibir a resposta do tipo Th<sub>1</sub>, atuando sobre Th<sub>0</sub>, para expressão de citocinas com padrão Th<sub>2</sub> (SILVA *et al*, 1995; GOLDEN; TARLETON, 1991; HARRIS *et al*, 2002).

No presente trabalho foi estudado o papel do Óxido Nítrico em macrófagos peritoneais e esplênicos. O óxido nítrico é um dos mecanismos de morte de parasitas, como demonstrado em vários trabalhos (MILLAR; KAHN, 2000; CUMMINGS; TARLETON, 2004). Também já tem sido descrito que a iNOS possui uma estreita relação com a COX-2 e que os produtos metabólicos de ambas atuam em algumas citocinas, podendo controlar a

resposta imune (AKARASEREENONT, *et al*, 1995; SAEFTEL; FLEISCHER; HOERAUF, 2001). A análise da concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais e esplênicos estimuladas com LPS obtidas de animais infectados por *T.cruzi* revelou que, embora a produção não seja diferente do observado nos controles, ela foi mais alta.

Avaliando a produção de NO nos macrófagos peritoneais, nos animais que receberam como tratamento PBS, a síntese de NO está reduzida, estando de acordo com vários trabalhos da literatura que demonstram a ação inibitória da PGE2 sobre a síntese de NO (SOWA; PRZEWLOCKI, 1994; HIROKAWA *et al*, 1994, PINGE FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSONH, 1999; ABDALLA *et al*, 2007).

Neste estudo, verificamos que não houve diferença significativa nas dosagens de Óxido Nítrico em células esplênicas entre o grupo dos animais que recebeu tratamento com as drogas inibidoras de COX-2 e o grupo que recebeu PBS. Entretanto vários trabalhos empregam as células esplênicas para demonstrar a NO na infecção chagásica (HÖLSCHER *et al*, 1998; MILLAR; KAHN, 2000; GOÑI; ALCAIDE; FRESNO, 2002; CUMMINGS; TARLETON, 2004). Em outros estudos, a dosagem de NO foi realizada utilizando-se lavado peritoneal (SAEFTEL; FLEISCHER; HOERAUF, 2001; AKARASEREENONT *et al*, 1995; JACOBS *et al*, 1998) e ainda há outros trabalhos que realizaram em mais de um destes materiais (HÖLSCHER *et al*, 1998; CUMMINGS; TARLETON, 2004; ABDALLA *et al*, 2007), demonstrando que pode haver diferença entre os valores encontrados. Esse fato aponta para a hipótese de que a síntese de NO nos animais que receberam tratamento com inibidor de COX-2 pode estar atuando de maneira diferente dependendo do local analisado. O trabalho de Hölscher e colaboradores (1998) avaliou a concentração de NO obtida de diversos locais e demonstrou como células esplênicas, soro e lavado peritoneal eram diferentes, bem como dependentes também do estímulo dado a estas células. E a cultura de células esplênicas apresentou a menor dosagem ao comparar com as demais medidas em outros locais, corroborando com nosso estudo, no qual obteve valor diminuído na cultura de células esplênicas comparadas com a do lavado peritoneal.

Os animais tratados com Etoricoxib apresentaram um pico de parasitemia inferior e maior dosagem de NO comparados com os animais que receberam PBS. Este fato comprovado, baseado em dados da literatura, demonstra o papel do NO como tripanomicida (HÖLSCHER *et al*, 1998; SAEFTEL; FLEISCHER; HOERAUF, 2001).

Porém outro trabalho apresentou o papel do NO na fase aguda da infecção chagásica experimental, demonstrando, após ter utilizado inibidores da iNOS, que o NO teria papel tripanomicida somente nos primeiros dias da infecção (SAEFTEL; FLEISCHER; HOERAUF, 2001).

Ao compararmos a dosagem do NO em relação ao sexo, verificamos uma maior concentração nos camundongos machos do que no grupo experimental das fêmeas, o que nos leva a acreditar que o estrógeno possa ter um papel inibidor na síntese de NO e que seriam de fundamental importância maiores estudos a fim de esclarecer determinada hipótese.

Analisando a parasitemia dos animais infectados e tratados com etoricoxib, observamos que ocorre uma diminuição significativa do número de parasitas que correlaciona com o aumento da sobrevivência nestes animais. Portanto, diante destes resultados, podemos supor que existem outros mecanismos de controle da parasitemia, independente da produção de NO<sub>2</sub>.

Acreditamos que os dados obtidos neste estudo estão de acordo com os da literatura, baseando-se principalmente no estudo de Hölscher e colaboradores (1998), assim, o NO estaria aumentado nos animais que receberam tratamento atuando de forma decisiva na eliminação do parasita no sangue dos camundongos, favorecendo de maneira conjunta com outras citocinas do padrão Th<sub>1</sub>, e em equilíbrio com as do padrão Th<sub>2</sub>, na diminuição do infiltrado inflamatório e da fibrose no parênquima cardíaco, principalmente, após a diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub> por inibição da COX-2.

Os achados deste estudo permitem pensar que as drogas inibidoras da COX-2 possam estar atuando favoravelmente na doença de Chagas experimental na fase aguda, uma vez que a parasitemia e miocardite apresentaram uma pequena redução nos animais que receberam a droga. O que poderia estar ocorrendo seria uma melhora da resposta imune de padrão Th<sub>1</sub>, devido à diminuição dos níveis de PGE<sub>2</sub>, favorecendo uma melhora da síntese de NO pela iNOS, mas estes fatores atuando em equilíbrio com a resposta imune padrão Th<sub>2</sub>.

## 6. CONCLUSÃO

- Animais infectados e tratados com droga inibidora da Ciclooxigenase mostraram uma redução na parasitemia e no infiltrado inflamatório.
- Animais infectados e tratados com inibidor da COX-2 apresentaram altos níveis de Óxido Nítrico no lavado peritoneal.
- Houve maior infiltrado inflamatório no grupo de animais infectados tratados com PBS.
- Houve maior infiltrado inflamatório nas fêmeas, embora o tamanho da amostra de infectados fêmea não tenha sido suficiente para comprar.
- Óxido Nítrico tem um papel tripanomicida importante na proteção de lesões cardíacas.
- Ao empregarmos drogas inibidoras da COX-2, reduzem-se os níveis de PGE2.

Portanto, a inibição Prostaglandina confere uma melhor resposta imune de padrão Th<sub>1</sub>, favorecendo um aumento da síntese de NO pela iNOS, mas estes fatores atuando em equilíbrio com a resposta imune padrão Th<sub>2</sub>.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G. C. Imunologia da doença de Chagas. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília DF, v. 35, n. 7, p. 101-108, 1983.

ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E. L.; SILVA, K. T.; CASTRO, E. C. C.; REIS, M. A.; MICHELIN, M.A. *Trypanosoma cruzi*: The role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 514-521, 2008.

ABEL, L. C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 30, n. 11, p. 1305-1308, 1997.

ABEL, L. C. J.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Autoimmun.**, London, v. 17, n. 1, p. 99-108, 2001.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 84, n. 2, p. 231-244, 1996.

ABRAHAMSOHN, I. A.; SILVA, A. P. G.; COFFMAN, R. L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection Immunity**. v. 68, n. 4, p. 1975-1979, Apr. 2000.

AKARASEREENONT, P.; MITCHELL, J.A.; BAKHLE; THIEMERMANN, C.; VAN, J.R. Comparison of induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. **European Journal Pharmacology**. V. 273, p. 121-128, 1995.

ALCAIDE, P.; FRESNO, M. AgC10, a mucin from *Trypanosoma cruzi*, destabilize TNF and cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. **Eur J Immunol**. v. 34, p. 1695-1704, 2004.

ALIBERTI, J. C.S.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P. M. P.; LANNES VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor R1 deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal**

**Pathology**, v. 158, n. 4, p. 1433-1439, Apr. 2001.

ALMEIDA-LEITE, C. M.; GALVAO, M. C.; AFONSO, L. C.C.; CUNHA, F. Q.; ARANTES, R.M.E. Interferon- $\gamma$  induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi* – infected macrophages. **Neurobiology of Disease**, v. 25, p. 170-178, 2007.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 100, n. 4, p. 269-275, 2002.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHÃES, J.B.; NETTO, M.B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Med Trop Parasitol.** v. 79, n.4, p. 397-407, 1985.

ANDRADE, S. G.; FILHO, A.C.; DE SOUZA, A. J. M.;LIMA, E. S.; ANDRADE, Z. A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int J Exp Pathology.** v. 78, p. 391-399, 1997.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOBRAL, K.S.; MAGALHÃES, J.B.; GUEDES, R. S.; GUERREIRO, M.L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.1, p. 1-8, 2006.

ANDRADE, V.; ANDRADE, S. G.; NETTO, M. B.; PONTES, A. L.; CASTRO, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 18, n. 3, p. 143-154, 1985.

ANDRADE, Z. A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 103-119, 1958.

ANDRADE, Z. A. Patogenia da doença de Chagas. Novos aspectos. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 255-260, 1982.

ANDRADE, Z.A. A patogenia da doença de Chagas face ao tratamento específico. **Rev Soc Bras Med Trop.** n. 29, supl II, p. 68-71, 1996.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 94, supl. I, p. 71-80, 1999.

AÑEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALEZ, N.; PERCOCO, G.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am. J. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 60, n. 5, p. 726-732, 1999

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN- $\gamma$  production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v. 71, p. 103-109, 2000.

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. Early IFN- $\gamma$  production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**. v. 79, p. 189-196, 2001.

ARANTES, R. M. E.; MARCHE, H. H.F.; BAHIA, M.T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon- $\gamma$  induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **American Journal pathology**. V. 164, n.4, p. 1361-1369, 2004.

AZOUBEL, M.C.F.; MENEZES, A.M.A.; ORIÁ, R.B.; BEZERRA, D.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 117-125, 2007.

BENEVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S. Lesões Epicárdicas na Cardiopatia Chagásica são reflexos de Processo Inflamatório. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 88, n. 4, p. 496-498, 2007.

BILATE, A.M.B.; CUNHA-NETO, E. Chagas Disease cardiomyopath: current Concepts of an old disease. **Rev Inst. Med Tropical**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 67-74, Mar-Apr, 2008.

BORGES, M.M.; KLOETZEL, J.K.; ANDRADE JR, H.F.; TADOKORO, C.E.; PINGE FILHO, P.; ABRAHAMSOHN, I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**. v. 63, p. 1-8, 1998.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, supl., p. 205-213, 1987.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, New York, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 10, p. 170-176.

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

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade morbida do homem. Resumo geral de estudos etiológico e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 219-275, 1911.

CHANDRA, M.; TANOWITZ, H. B.; PETKOVA, S.; HUANG, H.; WEISS, L.M.; WITTNER, M.; FACTOR, S.M.; SHTUTIN, V.; JELICKS, L.A.; CHAN, J.; SHIRANI, J. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). **Internacional Journal Parasitology**. v. 32, p. 897-905, Feb. 2002.

COSTA, V.M.; TORRES, K.C.; MENDONÇA, R.Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K.J.; ABRAHAMSON, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.**, v. 1, n. 177, p. 3193-3200, 2006.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R.L. Inducible nitric oxide is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection Immunity**. v. 72, n. 7, p. 4081-4089, 2004.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Immunology**, Oxford, v. 92, n. 8, p. 3541-3545, 1995.

DALMORA, S.L.; BRUM JR, L.; FERRETTO, R.M.; OLIVEIRA, P.R.; BARTH, T.; SARGOI, M.S. Determination of Etoricoxib in human plasma using automated on-line solid-phase extraction coupled with LC-APC/MS. **Quim Nova**, v. 31, n. 3, p. 574-578, 2008.

DaROCHA, W. D. BARTHOLOMEU, D. C.; MACÊDO, C.D.; HORTA, M. F.; CUNHA-NETO, E.; DONELSON, J.E.; TEIXEIRA, S. M. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigen expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes.

**Parasitol Res.**, Berlin, v. 88, n. 4, p. 292-300, 2002.

DA SILVA, A. P.G.; ABRAHAMSOHN, I. A. Interleukin -12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**. v. 104, p. 349-354, 2001.

DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAUJO, R.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 35, n.4, p. 323-330, 2002.

DIAS, J. C. P. Acute Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl., p. 85-91, 1984.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, DF, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.

DOS SANTOS, P.V.A.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H. C.; TORRES, R.A.; MARINO, A.P.M.P.; PAIVA, C.N.; SILVA, A.A.; GAZZINELLI, R.T.; LANNES VIEIRA, J. Prevalence of CD8+  $\alpha\beta$  T cells in *Trypanosoma cruzi* elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L low LFA-1 high VLA-4 high activation phenotype and expression of IFN- $\gamma$  inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes Infection**. n.3, p. 971-984, 2001.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. de MELLO, F.G., DosREIS, G. A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, London, v. 404, n. 6780, p. 199-203, 2000.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves L-arginine-dependent, nitrogen oxide mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 22, n. 10, p. 2501-2506, 1992.

GIRONÉS, N.; RODRÍGUEZ, C.I.; CARRASCO-MARÍN, E.; HERNÁEZ, R.F.; REGO, J.L.; FRESNO, M. Dominant T- and B-cell epitopes in a natural autoantigen linked to Chagas' disease. **The Journal Clinical Investigation**. v. 107, n.8, p. 9985-9993, 2001.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage

trypanocidal activity. **Exp Parasitol.** v. 72, n. 4, p. 391-402, 1991.

GOMES, J.A.S.; BAHIA OLIVEIRA, L.M.G.; ROCHA, M.O.C.; MARTINS FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas's disease is due to a Th1 specific immune response. **Infection Immunity.** p. 1185-1193, mar. 2003.

GOÑI, O.; ALCAIDE, P.; FRESNO, M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1+) CD11 b+ immature myeloid suppressor cells. **International Immunology.** V. 14, n. 10, p. 1125-1134, 2002.

GORELIK, G.; BORDA, E.; POSTAN, M.; CAPPA, S.G.; STERIN BORDA, L.T. lymphocytes from *Trypanosoma cruzi* infected mice alter heart contractility: participation of arachidonic acid metabolites. **J Mol Cell Cardiol.** v. 24, p. 9-20, 1992.

GRANGER, D. L.; LEHNINGER, A.L. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. **J Cell Biol.** V. 95, n.2, p. 527-535, 1982.

GREEN, T. R.; SCHAEFER, R. E. Intrinsic dichlorophenolindopherol reductase activity associated with the superoxide-generating oxidoreductase of human granulocytes. **Biochemistry.** v. 20, n.26, p. 7483-7487, 1981.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunology.** v. 23, n.3, p. 144-150, 2002.

HATCHER, F. M.; KUHN, R. E.; CERRONE, M.C.; BURTON, R. C. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **J Immunol.**, Baltimore, v. 127, n. 3, p. 1126-1130, 1981.

HIGUCHI, M. L. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 94, supl I, p. 263-267, 1999.

HIGUCHI, M. L.; BENVENTURI, L. A.; REIS, M.M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Res.**, London, v. 60, n. 1, p. 96-107, 2003.

HIROKAWA, K.; O'SHAUGHNESSY, K.M.; RAMRAKHA, P.; WILKINS, M.R. Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. **Br J Pharmacol.** v. 113, n. 4, p. 1448-1454, 1994.

HOFT, D. F.; SCHNAPP, A. R.; EICKHOFF, C. S.; RODMAN, S.T. Involvement of CD4+ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infection Immunity**. P. 197-204, 2000.

HÖHLER, T.; KRUGER, A.; GERKEN, G.; SCHNEIDER, P.M.; MEYER ZUM BÜSCHENEFELDE, K.H.; RITTNER, C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. **J. Med. Virol.**, New York, v. 54, n. 3, p. 173-177, 1998.

HÖLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MÜLLER, U.; MOSSMAN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection Immunity**. v. 66, n.3, p. 1208-1215, Mar. 1998.

IBRAHIM, A.; KARIM, A.; FELDMAN, J.; KHARASCH, E. The influence of parecoxib, a parenteral cyclooxygenase-2 specific inhibitor, on the pharmacokinetics and clinical effects of midazolam. **Anesth Analg**. v. 95, n. 3, p. 667-673, 2002.

JACOBS, F.; CHAUSSABEL, D.; TRUYENS, C.; LECLERQ, V.; CARLIER, Y.; GOLDMAN, M.; VRAY, B. IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolisaccharide (LPS) activated macrophages: improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin Exp Immunol**. v. 113. p. 59-64, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**. v. 11, p. 447-455, 1979.

KÖEBERLE, F. Patogenia da moléstia de Chagas: estudos dos órgãos musculares ôcos. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 3, n. 3, p. 155-180, 1957.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 116, n. 3, p. 755-760, 1976.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 128, n. 5, p. 2009-2012, 1982.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.

LAUCELLA, S. A.; ROTTENBERG, M. E.; de TITTO, E. H. Papel de las citoquinas en la resistencia y patología durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v. 28, n. 2, p. 99-109, 1996.

LIMA, E. C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M.H.; VASSALLI, P. MINOPRIO, P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 65, n. 2, p. 457-465, 1997.

LIMA, E. C.; ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 82, n. 6, p. 327-336, 2001.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; ANDRADE, Z.; ALMEIDA, H.O.; ROCHA, A. Anatomia patológica de corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 189-197, 1981.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W.L.; PRATA, A.R. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas. In: LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P.; TAFURI, W.L. **Bogliolo Patologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1320-1425.

LOPES, M. F.; da VEIGA, V. F.; SANTOS, A. R.; FONSECA, M. E. ; DosREIS, G. A. Activation-induced CD4<sup>+</sup> T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol.**, Baltimore, v. 154, n. 2, p. 744-752, 1995.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de Chagas Humana. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R.C (org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. 486p. p. 67-84, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MANOEL-CAETANO, F.S.; SILVA, A.E. Implication of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the patogénesis of Chagas disease. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 10, p. 2263-2274, out. 2007.

MARINHO, C.R.F.; LIMA, M.R.D.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. Influence of acute phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infection Immunity**. p. 308-318, 1999.

MARTINS, G. A.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; SILVA, J.S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol.**

**Lett.**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 113-120, 1998.

MARTINS, G. A.; VIEIRA, L.Q.; CUNHA, F. Q. SILVA, J. S. Gamma interferon modulates CD95 (Faz) and CD95 ligand (Faz-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infection Immunity**. v. 67, n.8, p. 3864-3871, Aug. 1999.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropismo f different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol**. v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.

MELO, R.C.N.; MACHADO, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Experimental Parasitology**. v. 97, p. 15-23, 2001.

MICHELIN, M.A.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol**. v. 111, n. 2, p. 71-79, 2005.

MICHELIN, M.A.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Exp Parasitol**. v. 102, n. 3-4, p. 170-177, 2002.

MILLAR, A.E.; KAHN, S. J. *Trypanosoma cruzi*: the effect of nitric oxide synthesis inhibition on the CD4 T cell response to the trans-sialidase superfamily. **Exp Parasitol**. v. 94, p. 84-91, 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**. n. 43, p. 109, 1991.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. **J Immunol**. v. 136, n.7, p. 2348-2357, 1986.

NUNES, M.C.P.; BARBOSA, M.M.; BRUM, V.A.A.; ROCHA, M.O.C. Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chaga's dilated cardiomyopathy. **International Journal Cardiology**. v. 94, n.1, p. 79-85, 2004.

PHIPPS, R. P.; STEIN, H. S.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol Today**. v. 12, n.10, p. 349-352, 1991.

PINGE FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunology**. v. 193, p. 90-98, 1999.

PRATA, A.; MACÊDO, V. Morbidity of Chagas' heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl., p. 93-96, 1984.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet**, London, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L.H. Métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Version en castellano editada y traducida por HEFFES, C. S.; MULLICK, F.G., 1992.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I.A. Early twentieth century descriptions of the Chagas Herat disease. **International Journal Cardiology**. v. 95, n. 3, p. 347-349, 2004.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophages activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol.**, Baltimore, v. 140, n. 12, p. 4342-4347, 1988.

REIS, D. D.; JONES, E.M.; TOSTES, S. Jr; LOPES, E. R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; McCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor alpha cells and dominance of granzyme A +, CD8+ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993.

REIS, D. D.; JONES, E.M.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G.; McCURLEY, T.L. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 49, n. 2, p. 192-200, 1993.

REIS, M. M.; HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; AIELLO, V.D.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R in Chronic Human Chagasic Myocarditis: correlation with the presence of myocardial *T. cruzi* antigens. **Clinical Immunology Immunopathology**. v. 83, n.2, p. 165-172, May, 1997.

RIENDEAU, D.; PERCIVAL, M.D.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; DUBÉ, D.; ETHIER, D.; FALGUEYRET, J.P.; FRIESEN, R.W.; GORDON, R.; GREIG, G.; GUAY,

J.; MANCINI, J.; OUELLET, M.; WONG, E.; XU, L.; BOYCE, S.; VISCO, D.; GIRARD, Y.; PRASIT, P.; ZAMBONI, R.; RODGER, I.W.; GRESSER, M.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; YOUNG, R.N.; CHAN, C.C. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 296, n. 2, p 558-566, 2001.

ROPER, R.L.; PHIPPS, R. P. Prostaglandin E2 regulation of the immune response. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.** n.22 , p. 101-111, 1994.

SAEFTTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection Immunity.** p. 2252-2259, 2001.

SHENG, G.G.; SHAO, J.; SHENG, H.; HOOTON, E.B.; ISAKSON, P.C.; MORROW, J.D.; COFFEY, R.J.; DUBOIS, R.N.; BEAUCHAMP, R.D. A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. **Gastroenterology.** v.113, n.6, p. 1883-1891, 1997.

SICHER, S. C.; VASQUEZ, M. A.; LU, C.Y.. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. **J. Immunol.** V. 153, n.3, p. 1293-1300, 1994.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J. Exp. Med.**, New York, v. 174, n. 3, p. 539-545, 1991.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.G.; ALIBERTI, J.C.S.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection Immunity.** v. 63, n.12, p. 4862-4867, Sep. 1995.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J.C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PÁDUA, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 111-115, 1998.

SMITH, W.L.; MARNETT, L. J. Prostaglandin endoperoxidase synthase: structure and catalysis. **Biochim Biophys Acta.** V. 1083, p. 1, 1991.

SOARES, M. B. P.; SILVA MOTA, K.N.; LIMA, R.S.; BELLINTANI, M. C.; PONTES DE CARVALHO, L.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4 dissociation between inflammation and tissue parasitism. **American Journal Pathology.** v. 159, n. 2, p. 703-709, Aug. 2001.

SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z, ANDRADE, Z.A. BARRA-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2 ed. 431 p. 88-126, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SOWA, G.; PRZEWLOCKI, R cAMP analogues and cholera toxin stimulate the accumulation of nitrite in rat peritoneal macrophage cultures. **Eur J Pharmacol**. v. 266. n. 2, p. 125-129, 1994.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C.S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V.A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J.S.; GAZZINELLI, R.T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- $\gamma$  as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infection**. v.2, p.851-866, 2000.

TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi* –induced suppression of IL-12 production. I. Evidence for the presence of IL-12 producing cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 140, n. 8, p. 2763-2768, 1988.

TARLETON, R. L. Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 186-190, 1988.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol Today**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **TRENDS Parasitology**. v.19, n. 10, p. 447-451, 2003.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitology**. v. 18, n.6, p. 262-265, 2002.

UNE, C.; ANDERSON, J.; ÖRN, A. Role of IFN- $\gamma/\beta$  and IL-12 in the activation of natural killer cells and IFN- $\gamma$  production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Clin Exp Immunol**. v. 134, p. 195-201, 2003.

VANE, J.R.; BOTTING, R. M. Mediators from the endothelial cell. **Adv Pros Thromb Leuk Res**. n. 21. p. 627, 1990.

VANE, J.R.; BOTTING, R. M. **The prostaglandins**. In: Aspirin and other salicylates. Eds Vane, J.R.; Botting, R. M. Chapman & Hall, London, p. 17, 1992.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994.

WARD, L.S.; GUARIENTO, M. E.; FERNANDES, G.A.; MACIEL, R. M. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 32, n.3, p. 285-289, 1999.

WALKER, C.; KRISTENSEN, F.; BETTEN, F., de WECK, A. L. Lymphokine regulation of activated (G1) Prostaglandin E2 – induced inhibition of interleukin – 2 production. **J Immunol.** v. 130, p. 1770-1773, 1983.

WAYNFORTH, H.B.; FLECKNELL, P.A. **Experimental and surgical technique in the rat.** 2 ed. San Diego, EEUU. Academia Press Inc, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee. **Who Technical Report Series.** 811, 95p. 1991.

# 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](#)