UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da administração de Zinco e L-arginina na prenhez de ratas
Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à farmácia em 17/08/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Cássia Mariana Bronzon da Costa

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da administração de Zinco e L-arginina na prenhez de ratas

Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Cássia Mariana Bronzon da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Cássia Mariana Bronzon

Efeitos da administração de Zinco e L-arginina na prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2012.

82. : Il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Carraro – Abrahão, Ana Amélia.

1. Prenhez. 2. Zinco. 3. L-arginina. 4. *Trypanosoma cruzi*

Cássia Mariana Bronzon da Costa

Efeitos da administração de Zinco e L- arginina na prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos que por meio de quem Deus me presenteou com a vida e tudo quanto nela
conquistar, meus amores, José Antônio da Costa e Luciene
Silveira Bronzon da Costa,
Dedico...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a força necessária no momento exato. Por me cobrir com Seu amor e Sua graça sem jamais me deixar sozinha.

Aos meus pais, por me ensinarem a lutar pelos meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus irmãos, minha maior riqueza e meu porto seguro. Obrigada!

À Profa. Dra Ana Amélia Carraro Abrahão, por acreditar em mim e me ensinar o caminho correto. Sua paciência, compreensão e seu exemplo de dedicação certamente me inspiraram durante todo esse tempo. Obrigada pela oportunidade e por me ensinar a amar o nosso trabalho.

À querida Míriam Paula Alonso Toldo, por jamais ter dito não, por se fazer presente a tempo e a hora em momentos decisivos (inclusive os mais difíceis) durante esses quase dois anos. Sua bondade e seu coração generoso tornaram a caminhada mais leve. Obrigada por fazer parte da minha história, minha amiga e irmã.

À Kelly Cristina Rodrigues (Florzinha), por me acolher em sua casa, em sua linda família e em seu coração. Obrigada pela amizade sincera, pelo carinho, cumplicidade e por estar sempre por perto. Você é uma das melhores pessoas que eu tive o privilégio de conviver.

À minha xará Mariana Rosa, pelo exemplo de serenidade, pela deliberalidade e dedicação. de conforto. Sua amizade também foi um presente de Deus. Obrigada por tudo, Ma.

À querida roommate Jacqueline Guimarães, por toda atenção e cuidado dispensados, pelo convívio agradável, por toda generosidade, paciência e por suportar meu mau humor com complacência nos piores dias. Obrigada, flor.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia : Cristiana Gonzalez, Georgius, Inara. O trabalho e o apoio de vocês foram fundamentais.

Às queridas Wania Tavares (Sophia), Vânia Cláudia, Ana Turatti e Regina Albuquerque, por toda atenção que recebi de vocês. Muito Obrigada!

Ao colega de pós graduação Murilo Freitas, pela convivência e por estar sempre disposto a ajudar. Inclusive nos momentos finais! Obrigada pela dedicação à nossa causa. Conte comigo também.

A Inês Trindade, pela alegria contagiante e pelo carinho. Obrigada, querida.

Aos professores Paulo Portela, César Abreu e Rodrigo Canto por me ensinarem os poderes curativos do esporte e da atividade física. Obrigada por tornarem os meus dias melhores.

Aos meus padrinhos Tio Hélio e Tia Sandra, por sempre estenderem as mãos. Obrigada por cuidarem de mim desde sempre.

Aos meus tios e primos (todos!) pela torcida, apoio e carinho. Muito Obrigada!

A minha grande amiga Rebecca, e sua família que moram no meu coração. Obrigada por permanecerem ao meu lado.

A Renata Bittencourt, que mesmo de longe, não me perdeu de vista. Obrigada pela cumplicidade de todos esses anos. Obrigada de coração.

A Cislene, pela lealdade. Obrigada, Cis.

A minha vó, sempre otimista e orgulhosa a cada conquista. Obrigada.

Ao Prof Dr. Marley Garcia Silva (Bob), por me apresentar os caminhos da pesquisa e acreditar em mim muito mais que eu mesma. Obrigada por ter aberto as portas e por me convencer que era possível sim.

Ao Prof Dr. Carlos Eduardo Mendes D'Angelis, por também insistir e por muitas vezes ter a palavra que eu precisava ouvir. Obrigada pelo carinho, Du.

Ao Prof Dr. André Pitondo, sempre acessível quando precisei e por ensinar passos valiosos. Obrigada!

As colegas de pós graduação Fabrícia Santello, Vânia Brazão, "Angelita" e Marina, por tantos ensinamentos e pelo exemplo de competência e dedicação. Obrigada por também me acolherem.

A Gisele Miranda, pela generosidade e hospitalidade desde os primeiros passos em Ribeirão Preto.

A Gisele Bulhões, Christian Collins Kuehn, Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira, Carla Domingues Sponchiado e todos os colegas do laboratório de Parasitologia Profa. Dra. Rosa Domingues Ribeiro. Obrigada.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP - USP pela oportunidade.

Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia da FORP-USP pelo auxílio na confecção dos cortes histológicos.

Aos funcionários da secretaria de Pós- Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP- USP, pela boa vontade e empenho. Obrigada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP, pelo suporte financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – pela bolsa de estudo concedida.

Aos animais do laboratório, que inocentemente contribuíram para que esse trabalho se tornasse possível.

A todos aqueles que de alguma forma entraram na minha história e contribuíram para que essas páginas fossem escritas, peço a Deus que me permita agradecê-los com o passar dos tempos, pois certamente seria impossível retribuí-los apenas nessas linhas. Muito Obrigada.

“ A arte de interrogar não é tão fácil como se pensa. É mais uma arte de mestres do que discípulos; é preciso ter aprendido muitas coisas para saber perguntar o que não se sabe”
Jean Jacques Rosseau

“... Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa...”
João Guimarães Rosa

RESUMO

COSTA, C.M.B. **Efeitos da administração de Zinco e L-arginina na prenhez de ratos Wistar infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O zinco é um elemento de grande importância para o desenvolvimento intra-uterino e é usado durante a gravidez para auxiliar o crescimento fetal. A arginina, um aminoácido dibásico, além de ser necessário para o crescimento, apresenta importantes funções biológicas e fisiológicas. Alguns autores mostraram que a ingestão de arginina melhora a resposta imune. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o papel da suplementação alimentar de L-arginina e zinco na infecção chagásica experimental de ratas prenhes. Para tal, foram utilizadas ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 3º dia da prenhez e tratadas com L-arginina ou sulfato de zinco. Alguns parâmetros foram avaliados como a dosagem de óxido nítrico, citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, TGF- β , IL-4, IL-10), corticosterona, número de macrófagos, linfoproliferação de esplenócitos, parasitemia e análise histopatológica do coração, placentas e fetos. A administração de zinco e arginina causou redução do parasitismo sanguíneo e cardíaco, ocasionou um aumento significativo nas concentrações de NO e na proliferação de esplenócitos. Além disso, contribuiu para o melhor desenvolvimento fetal. Dessa forma, podemos sugerir que a suplementação com estes elementos pode ser utilizada como uma substância imunomoduladora alternativa e, juntamente com a terapia anti-parasitária específica, minimizar as agressões ao hospedeiro, evitando a administração por longos períodos da droga tripanocida que sabidamente produz sérios efeitos colaterais e teratogênicos.

Palavras-chave: Prenhez; zinco; L-arginina; *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

COSTA, C.M.B. **Effects of zinc and L-arginine administration during pregnancy of Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi***. 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Zinc is an important element for the intrauterine development and during pregnancy is used to assist fetal growth. Arginine, a dibasic amino acid, besides its importance in the growth process, has important biological and physiological functions. Some authors have reported that daily intake of arginine improves the immune response. The objective of this study was to investigate the role of dietary supplementation of L-arginine and zinc in experimental Chagas disease in pregnant rats. To this end, we used Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, on the 3rd day of pregnancy and treated with L-arginine or zinc sulfate. Some parameters were evaluated such as nitric oxide, cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2, TGF- β , IL-4, IL-10), corticosterone, number of macrophages, lymphocyte proliferation of splenocytes, parasitemia and histopathology of the heart, placenta and fetus. The administration of arginine and zinc caused a reduction in blood and heart parasitism, with a significant increase in the concentrations of NO and proliferation of splenocytes. Moreover, it contributed to a better fetal development. Therefore, we suggest that supplementation with these elements may be used as an alternative immunomodulating substance and together with the specific anti-parasitic therapy minimize the aggressions against the host, avoiding the administration of trypanocidal drugs over long periods that is known to produce serious side effects and teratogenic effects.

Key words: Pregnancy; zinc sulfate; L-arginine; *Trypanosoma cruzi*

RESUMÉN

COSTA, C.M.B. Efectos de la administración de Zinc y L-arginina en la preñez de ratas Wistar infectadas por la cepa Y del *Trypanosoma cruzi*. 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

El zinc es un elemento de gran importancia para el desarrollo intrauterino y es usado durante el embarazo para auxiliar al crecimiento fetal. La arginina, un aminoácido dibásico, además de ser necesario para el crecimiento, presenta importantes funciones biológicas y fisiológicas. Algunos autores mostraron que la ingestión de la arginina mejora la respuesta inmune. Así, el objetivo de este trabajo fue investigar el rollo de la suplementación alimentar de L-arginina y zinc en la infección chagásica experimental de ratas preñas. Para tanto, fueron utilizadas ratas Wistar infectadas por la cepa Y del *Trypanosoma cruzi* en el tercer día de la preñez, y tratadas con L-arginina o sulfato de zinc. Algunos parámetros fueron evaluados como el dosaje del óxido nítrico, citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, TGF- β , IL-4, IL-10), corticosterona, número de macrófagos, linfoproliferación de esplenócitos, parasitemia y análisis histopatológico del corazón, placentas y fetos. La administración de zinc y arginina causó reducción del parasitismo sanguíneo y cardíaco, ocasionó un aumento significativo en las concentraciones de oxido nítrico y en la proliferación de esplenócitos. Además, contribuyó para el mejor desarrollo fetal. De esa forma, podemos sugerir que la suplementación con estos elementos puede ser utilizada como una substancia inmunomoduladora alternativa y juntamente con la terapia antiparasitaria específica, minimizar las agresiones al hospedero, evitando la administración por largos períodos de la droga tripanocida que sabidamente produce serios efectos colaterales y teratogénicos.

Palabras clave: Embarazo; zinc; L-arginina; *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de invasão celular por <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2. Parasitemia em ratos Wistar fêmeas infectadas com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 8º e 15º dias após a infecção	21
Figura 3. Peso cardíaco, expresso em mg, de ratas Wistar fêmeas prenhas controles infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez	22
Figura 4. Peso do baço, expresso em mg, de ratas Wistar fêmeas infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez	23
Figura 5. Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mL, de ratas Wistar fêmeas controles (não infectadas) e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez	24
Figure 6. Proliferação de esplenócitos, induzidos ou não por ConA (4µg/mL), de ratas Wistar controles (não infectadas), e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez	25
Figura 7. Concentrações de NO (µM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS (10µg/mL), coletadas de ratas Wistar prenhas controles (não infectadas) e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez.....	27
Figura 8. Concentrações de corticosterona (ng/mL) determinadas no plasma de ratas Wistar prenhas controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez.....	29

Figura 9. Concentrações de IL-2 (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez 30

Figura 10. Concentrações de INF- γ (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez..... 31

Figura 11. Concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez..... 32

Figura 12. Concentrações de TGF- β (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez..... 33

Figura 13. Peso das placentas de ratas Wistar prenhas controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez..... 35

Figura 14. Diâmetro das placentas de ratas Wistar prenhas controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez..... 36

Figura 15. Comprimento dos fetos de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez,..... 37

Figura 16. Peso dos fetos de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 18º dia de prenhez.....	38
Figura 17. Aspecto histológico do coração de ratas Wistar prenhas infectadas sem tratamento (PI) (15º dia da infecção). Hematoxilina e eosina (400x).....	42
Figura 18. Aspecto histológico do coração de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com sulfato de zinco (PIZ) (15º dia da infecção). Hematoxilina e eosina (400x).....	43
Figura 19. Aspecto histológico do coração de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA) (15º dia da infecção). Hematoxilina e eosina (400x).....	44
Figura 20. Fotomicrografias da camada decídua da placenta do animal infectado sem tratamento (PI), mostrando grandes ninhos de amastigotas. HE (100x e 400x).....	45
Figura 21. Fotomicrografias dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> , sem tratamento. As fotos mostram presença de amastigotas na região decídua e presença de infiltrado inflamatório. HE (400x).....	46
Figura 22. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com sulfato de zinco (PIZ). As fotos mostram presença de ninho de amastigotas na região decídua. HE (400x e 1000x).....	47
Figura 23. Fotomicrografia da placenta de rata Wistar prenha infectada pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratada com sulfato de zinco (PIZ). Notar presença de ninho de amastigota no interior de célula gigante. HE (400x).....	48
Figura 24. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA). As fotos mostram presença de ninhos de amastigotas na região decídua da placenta. HE (400x).....	49

Figura 25. Aspecto histológico da placenta do animal infectado e tratado com L-arginina (PIA), mostrando amastigotas. HE (400x)..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de fetos das fêmeas prenhas controles, nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA).....34

Tabela 2. Número de fetos das fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA).....34

Tabela 3. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 15º dia da infecção e 18º dia de prenhez.....39

Tabela 4. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas nas placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 15º dia da infecção e 18º dia de prenhez..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C - Controle

ConA - Concanavalina A

ELISA - Enzyme Lynked Immunosorbent Assay

IFN- γ - Interferon Gama

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

iNOS - Óxido Nítrico Sintetase Induzida

iTregs - Células reguladoras induzidas

LPS - Lipopolissacarídeos

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MTT - Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium

NK - Células Natural Killer

NO - Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NOS - Óxido Nítrico Sintetase

PBS - Tampão Fosfato Salino

PC - Prenhas Controle

PCA - Prenhas Controle tratadas com L-arginina

PI - Prenhas Infectadas

PIA - Prenhas Infectadas Tratadas com L-arginina

PIZ - Prenhas Infectadas Tratadas com Zinco

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RPMI - Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)

SBF - Soro Bovino Fetal

Th - T Helper

Th1 - T Helper 1

Th2 - T Helper 2

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador- Beta

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

ZnSO₄ - Sulfato de Zinco

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumén	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Doença de Chagas Congênita e Resposta Imune	4
1.3. L-Arginina	9
1.4. Zinco	11
2. OBJETIVO	13
3. JUSTIFICATIVA	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Animais	15
4.2. Grupos Experimentais	15
4.3. Dias de Experimento	16
4.4. Parasitas	16
4.5. Infecção	16
4.6. Administração de sulfato de zinco e L-arginina	17
4.7. Morte dos animais	17
4.8. Coleta de sangue	17
4.9. Parasitemia	18
4.10. Técnica Histológica	18
4.11. Intensidade do parasitismo tecidual	18
4.12. Pesagem dos animais e órgãos	19
4.13. Taxa de mortalidade dos animais	19

4.14. Preparação da suspensão de células peritoneais e quantificação de óxido nítrico.....	19
4.15. Linfoproliferação de esplenócitos.....	20
4.16. Dosagens de corticosterona	20
4.17. Ensaios imunológicos – Dosagens de Citocinas.....	20
4.18. Análise estatística	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Parasitemia	22
5.2. Peso do Coração	23
5.3. Peso do Baço.....	24
5.4. Contagem de macrófagos.....	25
5.5. Proliferação de Esplenócitos.....	26
5.5.1. Grupos Controles (sem infecção) e Infectados	26
5.6. Produção de Nitrito por Macrófagos Peritoneais.....	28
5.6.1. Grupos Controles (sem infecção) e Infectados	28
5.7.1. Dosagem de Corticosterona	30
5.8. Dosagem de IL-2.....	31
5.9. Dosagem de INF- γ	32
5.10. Dosagem de TNF- α	33
5.11. Dosagem de TGF- β	34
5.12. Número de Fetos das Fêmeas Prenhas Controles e Infectadas pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	35
5.13. Resultados Morfológicos.....	36
5.13.1. Peso Placentário	36
5.13.2. Diâmetro Placentário.....	37
5.13.3. Comprimento fetal.....	38
5.13.4. Peso fetal	39
5.14. Resultados Histológicos.....	40
5.14.1. Intensidade do Parasitismo Cardíaco	40
5.14.2. Intensidade do Parasitismo Placentário	41
5.14.3. Intensidade do Parasitismo Fetal	42
5.14.4. Histopatologia do Coração	43

5.14.4.1. Grupo Infectado sem tratamento (PI)	43
5.14.4.2. Grupo Infectado e tratado com sulfato de zinco (PIZ)	44
5.14.4.3. Grupo Infectado e tratado com L-arginina (PIA)	45
5.14.5. Histopatologia da Placenta	46
5.14.5.1. Grupo Infectado sem tratamento (PI)	46
5.14.5.2. Grupo Infectado tratado com sulfato de zinco (PIZ)	48
5.14.5.3. Grupo Infectado tratado com L-arginina (PIA)	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

Descrita em 1909, no município de Lassance - MG, por Carlos Justiniano das Chagas, médico sanitaria, chefe do Serviço de Saúde Pública durante o combate à malária. Na ocasião da descoberta, a doença que leva o seu nome, foi anunciada como “Nova entidade mórbida entre os seres humanos”. Enquanto analisava insetos hematófagos da região do norte de Minas Gerais, entre os municípios de Corinto e Pirapora, Carlos Chagas observou, no intestino desses insetos, formas flageladas do agente etiológico e intuiu a possibilidade de uma nova doença levando em conta seus achados experimentais em mamíferos e a grande associação do vetor com a população humana. Além disso, Chagas descreveu todo o ciclo evolutivo do parasita, além dos sinais e sintomas clássicos da patologia (CHAGAS, 1909).

Nos princípios de 1909, quando Carlos Chagas dirigiu-se a Lassance, encontrou o primeiro caso humano, Berenice, em abril daquele ano (CHAGAS, 1922; COUTINHO & DIAS, 1999a). Tratava-se de uma criança de dois anos de idade que apresentava manifestações da fase aguda da doença. Sete anos mais tarde, Berenice foi encontrada sem quaisquer sintomas e com desenvolvimento normal (CHAGAS, 1909; SALGADO, 1980).

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum*. Os mecanismos de transmissão da doença são bem conhecidos e incluem a via vetorial, congênita, oral e por transfusão sanguínea. Alguns estudos ainda relatam a possibilidade de transmissão pelo leite materno e coito (BITTENCOURT, 2000).

O principal vetor da doença é o *Triatoma infestans*, podendo ser transmitida por outras espécies de triatomíneos pertencentes à Família Reduviidae como *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomacula*, *Triatoma dimidiata* entre outras (ZELEDON & RABINOVICH, 1981; RASSI, 2009).

O triatomíneo após realizar a hematofagia, deixa suas fezes e urina

contendo tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* na superfície da pele, as quais penetram passivamente através da solução de continuidade, ganhando a corrente sanguínea e sendo, posteriormente, fagocitados por macrófagos. *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório, causador de uma patologia debilitante que acomete milhares de pessoas ao redor do mundo. Estudos mostram que cerca de 30%-40% dos pacientes infectados desenvolvem a forma crônica da doença, caracterizada por complicações cardíacas, digestivas ou cardio-digestivas (TARTELON, 2007; RASSI et al., 2010; NAGAJYOTHI et al., 2012).

O agente causador da doença de Chagas consegue promover uma resposta imune mediada por células T, sem, contudo, ser eliminado.

Para entrar nas células do hospedeiro, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* se valem do fluxo de Ca^{2+} que a princípio desintegra o citoesqueleto de actina da célula (RODRIGUEZ, 1995). Estudos recentes mostraram que existe uma fusão lisossomal na presença de Ca^{2+} , que converte esfingomielina em ceramida, facilitando a invaginação do parasita dentro da célula, conforme apresentado na figura abaixo (FERNANDES et al., 2012).

Figura 1. Modelo de invasão celular por *T. cruzi* (FERNANDES et al., 2012).

Embora o controle da transmissão vetorial seja bastante efetivo, a doença de Chagas ainda representa um grande problema de saúde pública e uma das maiores causas de morbidade. Mundialmente, existe ao redor de 15 a 17 milhões de pessoas infectadas e mais de 90 milhões expostas ao risco de infecção (COURA & DIAS, 2009; SALOMON, 2012).

O ciclo silvestre da doença existe na natureza há milhares de anos. Os possíveis casos em humanos foram encontrados em múmias datadas de 9000 anos, no norte do Chile e sul do Peru (AFDERHEIDE et al., 2004).

O curso da doença é bastante complexo, envolve a presença de dois

hospedeiros - vertebrado e invertebrado - e quatro estágios distintos do parasita, cujas formas são bem definidas: tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas. O triatomíneo ingere as formas tripomastigotas sanguícolas, as quais não se dividem, e ao atingirem o intestino, se transformam em epimastigotas e se dividem por bipartição. Em aproximadamente 3 ou 4 semanas, as formas epimastigotas são transformadas em tripomastigotas metacíclicos que migram para a ampola retal do inseto vetor. Na ocasião do repasto sanguíneo, o inseto deixa suas fezes e urina, contendo o parasita, na superfície da pele do hospedeiro vertebrado. O mecanismo de invasão da célula é extremamente complexo e envolve a participação de inúmeras moléculas presentes na superfície do parasita e do hospedeiro. Essas moléculas são responsáveis pelo sucesso da invasão parasitária (SOUZA, 2010). Após a internalização, o parasita sofre mudanças morfológicas originando os amastigotas que por sua vez se multiplicam por divisão binária (RASSI, 2010).

Durante vários anos a doença de Chagas foi caracterizada como uma doença endêmica de países pobres, abrangendo principalmente, América Central e América do Sul, sendo basicamente uma patologia confinada a áreas rurais, não constituindo, assim, um problema de saúde pública nas demais áreas do mundo (KIRCHOFF, 2011). Mudanças no padrão migratório das populações, permitiram ao parasita atingir áreas não endêmicas, alterando drasticamente a epidemiologia da doença, a exemplo dos Estados Unidos, com mais de 300 mil indivíduos infectados, Canadá com mais de 5.500, Europa, com mais 80 mil, Japão com 3 mil e Austrália com mais de 1.500 indivíduos infectados (COURA & DIAS, 2009; COURA & VIÑAS, 2010; MACHADO et al., 2012).

Dessa maneira, a globalização da doença de Chagas sinaliza novos desafios e a busca de novas terapias e fármacos que possam modular o sistema imune frente à agressão parasitária (GAZINELLI, 2010; NAGAJYOTHI et al., 2012).

1.2. DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA E RESPOSTA IMUNE

A infecção chagásica congênita constitui sério problema em áreas endêmicas e não endêmicas, podendo causar aborto, parto prematuro, retardo de crescimento intra-uterino, placentite, nati e neomortalidade (BITTENCOURT et al.,

1984; SARTORI et al., 2002).

Estima-se que ocorram mais de mil casos de infecção congênita por ano em todo o mundo, considerando áreas endêmicas e não endêmicas, sendo a transmissão vertical uma forma contínua de infecção, podendo se estender por gerações (RUSSOMANDO et al., 2010).

Além disso, os mecanismos pelos quais se transmite a forma congênita da doença estão pouco esclarecidos, contudo, ela está associada à prematuridade, aborto, vulnerabilidade às infecções hospitalares em neonatos e má formação do feto, sendo mais intensa quando a infecção acontece no início da gravidez (FAUSTINO et al., 2010).

A transmissão congênita não pode ser evitada e, ainda que o diagnóstico precoce seja realizado, o tratamento convencional não é indicado para mulheres grávidas. O sucesso do tratamento da criança congenitamente infectada depende do diagnóstico específico nessa fase, já que é assintomática na maioria dos casos (RUSSOMANDO, 2010)

O recém-nascido infectado apresenta as mesmas manifestações da doença aguda não congênita ou mostra-se assintomático (FREILIJ & ALTCHEH, 1995). No entanto, manifestações peculiares à forma congênita da doença têm sido descritas, logo ao nascer ou poucos meses após, sendo relatadas manifestações digestivas como megaesôfago, alterações oculares, paralisia cerebral, microcefalia e calcificações cerebrais (BITTENCOURT, 1988). A infecção chagásica congênita pode ser fatal em aproximadamente 10% dos casos, a grande maioria com quadro de meningoencefalite, quase sempre letal em crianças com menos de dois anos de idade, segundo observações do próprio Carlos Chagas (CHAGAS, 1916).

A infecção por *T. cruzi* desencadeia uma resposta imune de padrão linfomonocitário. Nos tecidos, o parasita se multiplica formando ninhos que se rompem, levando à reação inflamatória e necrose. Os antígenos liberados pelo parasito ligam-se à superfície das células vizinhas, que se tornam alvos de resposta imune celular e humoral (MACEDO et al., 1998). Na maioria dos casos a resposta imune é exacerbada, causando graves danos aos tecidos do hospedeiro.

O trofoblasto placentário é uma barreira inicial a *T. cruzi* (BITTENCOURT, 1992), e também a região onde está localizada a maioria dos lisossomos (CORASH & GROSS, 1973). FRETES & FABRO (1995) mostraram que os lisossomos e a

atividade da fosfatase ácida lisossomal estão aumentados nas placentas de gestantes chagásicas que não transmitiram congenitamente a doença.

O lisossomo da célula hospedeira é uma importante organela para o ciclo de vida de *T. cruzi*, quando este infecta mamíferos. O lisossomo está envolvido na invasão do parasita na célula hospedeira (ANDREWS, 1995; RODRIGUES et al., 1999) e também nos mecanismos que limitam a infecção intracelular (MCCABE & MULLINS, 1990).

Além de constituir uma barreira natural que protege os tecidos fetais, a placenta apresenta papel crucial para o desenvolvimento fetal, como nutrição e trocas gasosas, e ainda participa na imunorregulação da gravidez. Além disso, apresenta mecanismos de defesa, que são parcialmente ou completamente efetivos, dependendo das características do patógeno. FRANK et al. (2000) mostraram menor viabilidade de tripomastigotas incubados com a sub-fração placentária lisossomal, confirmada por estudos *in vivo* e *in vitro*. A cultura de tripomastigotas sanguíneas proveniente de camundongos infectados com *T. cruzi* que sofreu tratamento lisossomal induziu uma menor parasitemia bem como poucas lesões miocárdicas. Estes resultados estão relacionados à menor carga parasitária, pois 76% dos parasitas morreram após a incubação com a sub-fração lisossomal placentária.

A ação lisossomal no combate parasitário encontra-se bem caracterizada, porém ocorre um paradoxo envolvendo estes mesmos lisossomos durante a infecção chagásica. O rearranjo da actina cortical (que posteriormente desaparece nas placentas infectadas com *T. cruzi*) pode ser o primeiro passo para o mecanismo de invasão das células placentárias, permitindo assim o acesso dos lisossomos à membrana plasmática, e conseqüente formação do vacúolo parasitóforo. Portanto, observa-se que o recrutamento dos lisossomos ocorre diretamente beneficiando a invasão, e este processo é necessário para internalização do parasita (SARTORI et al., 2003).

As concentrações de muitos hormônios sofrem variações não somente relacionadas às diferenças sexuais, mas também devido à idade, em ambos os sexos.

As alterações causadas pelos hormônios no sistema imune são decorrentes das adaptações evolucionárias que favorecem não somente um ambiente livre de patógenos, mas também um ambiente imunologicamente permissivo para a

implantação e desenvolvimento do feto. No entanto, durante a gravidez, os níveis de estrógenos e progesterona estão aumentados, sendo que a concentração de progesterona sobrepõe à de estrógeno, e esta alteração quantitativa apresenta a função de permitir o desenvolvimento fetal. Por outro lado, devido à ação destes hormônios sobre o sistema imune, a suscetibilidade às infecções parasitárias está aumentada (ROBERTS et al., 1996; ABRAHANSON & COFFMAN, 1996).

O estrógeno influencia múltiplas funções imunológicas. Os macrófagos apresentam receptores para estrógeno e sua capacidade fagocítica está aumentada na presença deste hormônio (ALEXANDER & STIMSON, 1988). O estrógeno pode modificar outras funções dos macrófagos, incluindo a produção de oxigênio reativo e intermediários do nitrogênio. Os estrogênios aumentam a ativação das células B e sua conseqüente produção de anticorpos frente a um diversificado repertório de antígenos (NILSSON & CARLSTEIN, 1994). A região promotora do gene para a produção de IFN- γ apresenta-se estimulada na presença de estrógenos, aumentando os níveis de RNAm transcriptase para a produção desta citocina (FOX et al., 1991). No entanto, a testosterona deprime a imunidade humoral e de certa forma a celular. Trabalhos pioneiros abordando a influência dos esteróides gonadais sobre a resposta imune frente aos parasitas foi descrito por ALEXANDER & STIMSON (1988). Especificamente com *T. cruzi*, PRADO JÚNIOR et al. (1998) e PRADO JÚNIOR et al. (1999) descreveram que os machos são relativamente mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* quando comparado às fêmeas.

A resposta imune protetora desenvolvida para o controle da carga parasitária e sobrevivência do hospedeiro é a do tipo Th1 (celular), onde os macrófagos ativados apresentam um papel crucial para exterminar formas intracelulares do protozoário (TARLETON et al., 1992; NICKELL et al., 1993; KIERSZEMBAUM & SZTEIN, 1994; ROTTENBERG et al., 1995). Células do sistema imune inato e específico podem sintetizar citocinas que ativam macrófagos para desenvolver atividade microbida, bem como citocinas que inibem esta ativação (ABRAHANSON & COFFMAN, 1996).

Macrófagos ativados produzem TNF- α que ativam células NK, por sua vez produzindo IFN- γ . Ambas as citocinas atuam de forma sinérgica ativando outros macrófagos a expressar a óxido nítrico sintetase (iNOS), enzima responsável por catalizar a reação para produção de óxido nítrico, que desempenha um papel

fundamental na morte de parasitas intracelulares (ABRAHANSON & COFFMAN, 1996; MUNHOZ-FERNANDEZ et al., 1992; SILVA et al., 1995; SOUZA et al., 2004; VIEIRA, 2012).

Durante o período de gestação ocorrem diversas alterações hormonais que influenciam diretamente a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. O hormônio esteróide progesterona, que se encontra em concentração muito elevada durante a gestação, é responsável por profundas alterações neste período, levando a uma imunossupressão da resposta imune materna. Essa alteração é essencial para o desenvolvimento da gestação a termo. Este hormônio induz a produção de IL-10 pelos macrófagos que estimula os linfócitos TCD4+ desenvolverem o padrão de resposta imune do tipo Th2 (humoral), também conhecida como resposta imune antiinflamatória. Este mecanismo age deprimindo o sistema imune materno impedindo que este reconheça o embrião ou feto como um componente estranho (ALOANTÍGENO) e desenvolva resposta imune contra este, evitando rejeição/aborto (ERLEBACHER, 2001; ROBERTS et al., 2001).

Existem relatos referentes à atuação de corticóides na doença de Chagas experimental, desenvolvida em diferentes espécies de animais, representados, sobretudo por roedores. Apesar de não haver unanimidade, as deduções geralmente indicam aumento da parasitemia, do parasitismo tecidual, da mortalidade, atenuação do contingente inflamatório, revelando também mudança do tropismo em relação aos órgãos que *T. cruzi* infecta (RASSI et al., 1997).

A concentração sérica de glicocorticóides está aumentada durante o período gestacional, e este hormônio esteróide, apresenta a característica de promover imunossupressão e também induz o padrão de resposta Th2 pelos linfócitos TCD4+, contribuindo ainda mais para instalação da doença (BRABIN & BRABIN, 1992).

Este mecanismo é essencial para ocorrência da gestação a termo, entretanto, a gestante é prejudicada, pois fica mais suscetível às infecções (ABRAHANSON & COFFMAN, 1996). Devido à imunossupressão desenvolvida durante a gestação, pode ocorrer uma reativação da doença de Chagas materna. Assim, as gestantes que apresentavam a forma indeterminada ou crônica da doença, podem voltar a desenvolver sintomas de fase aguda como alta parasitemia e presença de IgM sérica (ROBERTS et al., 2001), contribuindo ainda mais para ocorrência da transmissão transplacentária do parasita. Por outro lado, a resposta

imune parcialmente inibida em nível placentário é benéfica, pois os danos causados devido à reação inflamatória seriam menores, e dessa forma as trocas de metabólitos entre mãe e feto seriam menos prejudicadas.

Os mecanismos da transmissão congênita da doença de Chagas ainda permanecem desconhecidos. ALONSO-VEGA et al. (2005) estudaram alguns aspectos imunológicos na gravidez de mães infectadas, verificando que mães infectadas que transmitiram congenitamente a doença à seus bebês produziam menos IFN- γ e mais IL-10 quando comparadas com mães infectadas que não transmitiram a doença, indicando que a transmissão congênita da doença de Chagas está associada a um desequilíbrio imunológico e à alta taxa parasitária.

CARRARO-ABRAHÃO et al. (2003) estudaram as alterações morfológicas das placentas e fetos de camundongos infectados por *T. cruzi*, durante a prenhez, e observaram um intenso parasitismo placentário, redução no peso e diâmetro das placentas, bem como redução no tamanho e peso dos fetos de camundongos.

BADRA et al. (2008) descreveram as alterações histopatológicas nas placentas e fetos de camundongos infectados pela cepa Morc-1 de *T. cruzi* e demonstraram a transmissão transplacentária desta população do parasita.

1.3. L- ARGININA

A L-arginina constitui um aminoácido essencial aos mamíferos, abundante nos fluidos corporais (FLYNN et al., 2002) e apresenta importante função na manutenção da homeostase do sistema imune (WU et al., 2009; LI et al., 2007; PEKAROVA et al., 2011). Também está envolvida em diversas rotas metabólicas, participando da biossíntese de proteínas como a creatina, agmatina e ainda é utilizada como substrato para a síntese de óxido nítrico, L-ornitina e L-citrulina (VISEK, 1989; Böger & BODE-Böger, 2001; FLYN et al., 2002; BALAÑA – FOUCE et al., 2012).

O óxido nítrico (NO), produzido por macrófagos, é um componente tóxico a diversos microrganismos e constitui um fator fundamental na resposta imune inata. A arginina é a única fonte fisiológica de nitrogênio para produção de NO; condições que reduzam a disponibilidade de arginina no organismo podem limitar a produção de NO, aumentando a susceptibilidade frente a diversos patógenos (MUNDER,

2009; MORRIS, 2010).

Arginina é extremamente benéfica à função imune. LEWIS & LANGKAMP-HENKEN (2000) mostraram que a suplementação melhora a resposta imunológica em camundongos jovens, adultos e senescentes.

A arginina está diretamente envolvida na regulação de células T e macrófagos. Estudos clínicos sugeriram os benefícios da suplementação de L-arginina em humanos (WU et al., 1998; Bront, 2005).

A administração de arginina em níveis farmacológicos previne a involução tímica e aumenta a proliferação de timócitos em roedores adultos jovens (Barbul et al., 1980a e 1980b). Em pessoas saudáveis a suplementação de arginina aumenta a proliferação de linfócitos sanguíneos induzida por mitógeno (Barbul et al., 1981a).

A suplementação com esse aminoácido, em condições fisiológicas ou patológicas (como na gravidez, sepse ou trauma) é essencial para o organismo, uma vez que a demanda necessária excede a capacidade de produção desse elemento (LUIKING et al., 2004; BERNARD et al., 2001; BRONTE & ZANOVELLO, 2005).

A arginina também é capaz de regular funções como o crescimento, desenvolvimento ovariano e implantação do feto, pois o óxido nítrico é fundamental na produção de hormônios esteróides, ovulação e no início do trabalho de parto (WU, 2008).

Alguns estudos mostram a importância da arginina para o crescimento fetal e placentário, contudo, o seu papel ainda não está totalmente esclarecido (WO, 2004). Trabalhos recentes mostraram que a suplementação alimentar com L-arginina em ratos, no início da prenhez, aumentou o peso dos fetos e o número de fetos por ninhada, sugerindo um papel benéfico desse aminoácido durante a gestação (ZENG, 2008; GREENE et al., 2012).

4. ZINCO

Alterações de alguns elementos essenciais durante a gravidez podem representar um risco potencial à saúde da mãe e do feto. Vários estudos epidemiológicos propõem que um pré-natal adverso pode alterar o crescimento fetal. O zinco é um micronutriente essencial que participa no metabolismo de carboidratos e proteínas, na síntese de ácidos nucleicos e outras funções vitais

(WELLINGHAUSEN, 2001).

O zinco está envolvido na defesa contra o estresse oxidativo, além de ser um co-fator essencial para a produção de timulina que por sua vez modula a liberação de citocina e induz a proliferação celular (MAGGINI et al., 2007; GUPTA et al., 2009). Além disso, o zinco exerce um papel importante na função do sistema imune do homem e de outros animais, influenciando tanto a imunidade inata quanto a adquirida (KRUSE-JARRES, 1989; WELLINGHAUSEN et al., 1997; WELLINGHAUSEN & RINK, 1998; PRASAD, 2007; RINK & HAASE, 2007; PRASAD, 1996; SHANKAR & PRASAD, 1998).

A ingestão adequada de zinco suporta uma resposta Th1 e ajuda a manter a integridade da membrana mucosa e da pele. Além disso, a suplementação de zinco aumenta os componentes celulares da imunidade inata (por exemplo, a fagocitose por macrófagos e neutrófilos, atividade de células NK, etc), resposta humoral e o número de células T CD8 (MAGGINI et al., 2007).

A necessidade de zinco durante a gravidez é acentuadamente aumentada, pois os níveis séricos declinam fisiologicamente devido à hemodiluição e decréscimo dos níveis de albumina (BEDWAL & BAHUGUNA, 1994; JAMESON, 1993).

A deficiência de zinco em mulheres adultas não grávidas e grávidas aumenta a suscetibilidade à infecção. Entretanto, as infecções podem ser mais prolongadas e severas durante a gravidez devido às alterações hormonais e metabólicas (FAVIER, 1992). Um dos primeiros e mais relevantes sinais clínicos da deficiência de zinco materno são os baixos títulos de imunoglobulinas naturais, onde se faz incluir defeitos persistentes na produção de IgM, e transitoriamente, nos níveis diminuídos de IgA e IgG2 no neonato (FAVIER, 1992). Uma das explicações para este fato está relacionado a diminuição do transporte placentário das imunoglobulinas (SHANCAR & PRASAD, 1998).

Estudos em animais mostraram que tanto camundongos como macacos, com deficiência de zinco pré-natal, apresentaram uma redução do tamanho dos órgãos linfóides tais como timo e baço (BEACH et al., 1982a). No que se refere à função das células T, filhotes provenientes de mães que tiveram ingestão inadequada de zinco apresentam diminuição da proliferação celular em resposta a mitógenos (KEEN & GERSHWIN, 1990).

2. OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos da administração de sulfato de zinco e L- arginina em ratas prenhas durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, através da quantificação de parasitas sangüíneos e teciduais; bem como avaliação do peso e comprimento fetal, peso e diâmetro placentário;
- Detectar possíveis alterações na resposta imune de ratas infectadas e tratadas com estas substâncias, através de ensaios de linfoproliferação de esplenócitos frente a estímulo com concanavalina, quantificação de óxido nítrico, corticosterona, assim como a concentração de citocinas pertencentes ao padrão Th1 e Th2 , tais como $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-2, IL-4, IL-10 e $TGF-\beta$.
- Avaliar o efeito destas substâncias no parasitismo tecidual através do estudo histopatológico do coração, placenta e fetos.

3. JUSTIFICATIVA

Os micronutrientes como zinco e arginina são essenciais para o bem estar do embrião, feto e neonato. Apesar dos importantes efeitos da suplementação de micronutrientes no período pré e pós-natal, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune. O desbalanceamento de micronutrientes durante a gravidez pode induzir sérias alterações metabólicas como consequência de sua falta nas enzimas e fatores de transcrição e seu envolvimento nos sinais de transdução que regulam o crescimento. Como é de conhecimento a deficiência de zinco leva a um prejuízo na função imune, consequentemente aumentando a suscetibilidade às infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. Dessa forma, nossa hipótese baseia-se na administração de oligoelementos como o zinco e o aminoácido arginina em exercer um efeito imuno-estimulatório na resposta de ratas Wistar prenhas infectadas com *Trypanosoma cruzi*. O nosso estudo avaliou os efeitos da administração de zinco e L-arginina através de diferentes parâmetros tais como a dosagem de citocinas, óxido nítrico, linfoproliferação de esplenócitos, além dos efeitos benéficos destes no tamanho e peso fetal. Outra abordagem realizada foi a avaliação das concentrações de corticosterona, normalmente mais elevadas durante o período gestacional e as possíveis influências da administração de zinco e arginina como agentes antagonistas à produção de elevadas concentrações deste hormônio que sabidamente leva a uma maior suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*, de forma a entender os mecanismos pelos quais os animais, durante o período gestacional, respondem às infecções parasitárias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 50 ratas fêmeas prenhas, da linhagem Wistar, adultos jovens (50-60 dias), pesando entre 180 e 240 gramas, provenientes de uma colônia mantida nos biotérios da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração. A maravalha das caixas foi trocada três vezes por semana para evitar acúmulo de amônia.

Para a determinação do primeiro dia da prenhez, as ratas foram colocadas para acasalamento com os machos durante a noite, na proporção de duas fêmeas para cada macho, verificando-se a presença do tampão vaginal e determinando assim o primeiro dia da prenhez. Após o acasalamento, as fêmeas foram mantidas em caixas individuais, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Foi dada preferência a ratos em decorrência da eficiente resposta imune apresentada por este modelo experimental à infecção por *T. cruzi* (BRENER, 1965; BRENER & CHIARI, 1963).

4.2. Grupos Experimentais

Grupos Controles (prenhas)

PC - Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (n=5)

PCZ - Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com sulfato de zinco (n=5)

PCA - Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com aspartato de arginina (n=5)

Grupos Infectados (prenhas)

PI - Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* no 3º dia de prenhez, sem tratamento (n=5)

PIZ - Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* no 3º dia de prenhez e tratadas com sulfato de zinco (n=5)

PIA - Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* no 3º dia de prenhez e

tratadas com aspartato de arginina (n=5)

4.3. Dias de Experimento

Os experimentos foram realizados no 15º dia de infecção, correspondendo ao 18º dia da prenhez. Esses dias foram escolhidos, baseado na curva parasitêmica, onde o pico de parasitemia ocorre entre o 7º e 15º dia após o inóculo. Assim, foram estudados os efeitos dos oligoelementos na fase aguda da infecção e no final da prenhez de ratos Wistar (18º dia da prenhez).

Foram utilizados 5 animais para cada grupo experimental, conforme descrito anteriormente, totalizando 50 animais. As fêmeas prenhes foram mantidas em caixas individuais (1520 cm²).

4.4. Parasitas

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), por meio de xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção. Desde então, vem sendo mantida em camundongos Swiss não isogênicos, por repiques semanais de sangue infectado.

O estudo da cepa Y está bem preconizado em diferentes modelos experimentais inclusive em ratos (UYEMURA et al., 1995). A cepa Y possui morfologia fina com pico parasitêmico precoce, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA & SCORZA, 1972). Em ratos, o padrão da curva parasitêmica se mantém semelhante aos dos roedores de menor porte, com um pico compreendido entre o 7º e 15º dia da infecção (ANDRADE et al., 1970; ANDRADE, 1974; UYEMURA et al., 1995).

4.5. Infecção

Os animais do grupo infectado foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* (no 3º dia de prenhez). Foi utilizada alta carga parasitária para que ocorram lesões tissulares e parasitemia

mais intensa, de modo a proporcionar uma melhor visualização das manifestações patológicas e desta maneira relatar as possíveis alterações ocorridas mediante o tratamento.

A contagem dos parasitas foi feita no 8º e 15º dias de infecção, pelo método de Brener (1962).

4.6. Administração de sulfato de zinco e L-arginina

Os grupos foram tratados via oral, com 20mg de sulfato de zinco / kg de peso / dia (Sigma Chemical Co. MO, USA) (BRAZÃO et al., 2009) e 21 mg de L-arginina / Kg de peso / dia (Sigma-Adrich, USA) (ALTUN et al., 2008), diluídos em água destilada, a partir do 4º dia da prenhez até o 18º dia da prenhez. Foi administrada uma dose das substâncias, uma vez ao dia, pela parte da manhã, obedecendo rigorosamente o mesmo horário de tratamento todos os dias.

4.7. Morte dos animais

Os animais foram mortos no 18º dia da prenhez, por decapitação, com anestesia prévia com tribromoetanol (25mg/Kg/animal) com o intuito de evitar que outras manipulações possam ocasionar estresse e desta maneira alterar a resposta imunológica (CALDEIRA & FRANCI, 2000; SANTOS et al., 2005). O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (Protocolo número 09.1.193.53.4).

4.8. Coleta de sangue

Após a morte dos animais, foi coletado 5 µl de sangue para determinação da parasitemia. Para dosagem de corticosterona foram coletados 3 ml de sangue em tubos plásticos (BD) contendo anticoagulante, para obtenção de plasma. Para a determinação das interleucinas, foi coletado em tubos plásticos de coleta (BD) um volume de 6 mL de sangue para obtenção de soro.

4.9. Parasitemia

A contagem de parasitas foi feita através do método de BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5 μ l de sangue infectado em uma lâmina, cobrindo-a com lamínula 22 x 22mm. Determinou-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos, selecionados em várias áreas do preparado. O número encontrado foi multiplicado por um fator, que leva em consideração o número de campos microscópicos existentes na área da lamínula.

4.10. Técnica Histológica

Foram coletados os seguintes órgãos: coração, placenta e fetos. Os órgãos foram pesados em balança eletrônica (Mettler H10W), lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em formol 10% tamponado e após 24 horas mantidos em álcool 80% até sua inclusão em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos de 6 μ m corados por hematoxilina-eosina, sendo 12 cortes/tecido/animal, num total de 600 cortes histológicos de coração, 600 cortes histológicos das placentas e 600 cortes histológicos dos fetos. A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70 μ m, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi* (CAMARGOS et al., 2000). Os cortes histológicos do coração foram examinados em microscópio óptico com aumento de 400x (MELO & BRENER, 1978).

4.11. Intensidade do parasitismo tecidual

O grau de parasitismo do coração foi avaliado, através de análise quantitativa, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X), sendo considerados todos os ninhos encontrados em cada campo (CASTRO & BRENER, 1985). Para esta análise foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental. A análise microscópica dos cortes histológicos das placentas e fetos está sendo feita e será apresentada no próximo relatório científico.

4.12. Pesagem dos animais e órgãos

Prévio à eutanásia, os animais foram pesados em balança eletrônica Mettler. Imediatamente após a abertura da cavidade abdominal para a realização dos outros experimentos, os órgãos e fetos foram imediatamente pesados.

4.13. Taxa de mortalidade dos animais

Para verificação da taxa de mortalidade foram observadas diariamente as caixas contendo os animais dos diferentes grupos experimentais, tratados e não tratados, durante o decorrer dos experimentos.

4.14. Preparação da suspensão de células peritoneais e quantificação de óxido nítrico

Os ensaios de produção de óxido nítrico foram realizados com células do lavado peritoneal. Os ratos tiveram a cavidade peritoneal lavada com 5 ml de RPMI a 4°C, que foi centrifugado por 15 minutos à 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” foi ressuspensionado com 1ml de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, retirou-se uma alíquota de 10µl que foi diluída em solução de Turk (990 µl), para contagem das células viáveis (macrófagos). Depois de contadas em câmara de Neubauer, as concentrações foram acertadas para 5×10^6 cel/ml; 100µl desta suspensão foi distribuída em placa de 96 poços, contendo 5×10^6 cel/poço, adicionando 100µl/ poço de LPS (10 µg/ml) (*E. coli*, sorotipo 026:B6, Sigma, USA) e levado à estufa contendo 5% de CO₂, durante 48 horas a 37°C.

Após este período, a placa foi centrifugada à 1500rpm durante 4 minutos. Recolheu-se 100µl do sobrenadante e transferiu-se para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Griess, permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas utilizando filtro de 540nm. A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando nitrito de sódio com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al., 1995; HRUBY et al., 1997). A leitura da absorbância foi realizada em aparelho de ELISA (SALTZMAN, 1954).

4.15. Linfoproliferação de esplenócitos

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem o MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium). As células do baço foram maceradas em placas descartáveis com 5ml de RPMI-1640 e levadas a centrifuga a 1000rpm por 10 minutos e desprezado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal. A concentração foi ajustada para 5×10^6 cel/ml. Foram distribuídos 100 μ l desta suspensão em placa de 96 poços, contendo 5×10^6 cel/ poço. Foram adicionados 100 μ l de concanavalina A (ConA: 4 mg/mL) nos poços estimulados. A placa foi levada à estufa contendo 5% de CO₂, durante 48 horas a 37°C. Após este período, a placa foi retirada e foi adicionado 50 μ l de MTT 0,5 mg/ml em RPMI incolor. Após 4 horas, foram adicionados 50 μ l de isopropanol. A absorvância (A) foi determinada após 1 hora utilizando leitor de microplacas, filtro de 570nm.

4.16. Dosagens de corticosterona

A determinação da concentração de corticosterona no plasma foi realizada utilizando Kit imunoenzimático (IBL America, USA) de acordo com instruções do fabricante e obtendo-se a leitura através do leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - μ Quant) em comprimento de onda de 450nm. As amostras foram avaliadas em duplicata no mesmo ensaio.

4.17. Ensaios imunológicos – Dosagens de Citocinas

Dosagens de TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 foram realizadas nas amostras de soro dos animais, através de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando Kits (R&D Systems, INC, USA). Em todos os ensaios foram adicionados padrões de concentrações conhecidas de acordo com as instruções do Kit utilizado. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata no mesmo ensaio. As densidades ópticas (D.O) das amostras foram lidas em leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - μ Quant) em comprimento de onda de 450nm. Os cálculos das concentrações das citocinas, em pg/mL foram obtidos utilizando o programa Magellan. Os dados foram processados em programas de estatística e devidamente plotados e analisados.

As concentrações mínimas de detecção de cada citocina foram: IL-2 (31,2 pg/mL), IFN- γ (31,2 pg/mL), TNF- α (12,5 pg/mL), TGF- β (31,2 pg/mL), IL-4 (15,6 pg/mL), IL-10 (31,2 pg/mL).

4.18. Análise estatística

A comparação entre os grupos foi feita através do teste de ANOVA, utilizando o post teste de Bonferroni para comparação dos grupos, considerando estatisticamente significativo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parasitemia

Figura 2. Parasitemia em ratas Wistar prenhas infectadas com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (8º e 15º dias após a infecção), nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, $n = 5$ animais / grupo experimental. $p < 0,05$.

A contagem de tripomastigotas sanguícolas foi feita no 8º e 15º dias após a infecção. O pico parasitêmico ocorreu no 8º dia após a infecção, com negativação da parasitemia no 15º dia para os grupos experimentais infectados e tratados com as substâncias (Fig. 1).

Os grupos tratados com zinco e arginina apresentaram redução da parasitemia sanguínea no 8º dia após a infecção, quando comparados ao grupo sem tratamento.

No 15º dia após a infecção a parasitemia foi detectada apenas no grupo sem tratamento (PI), sendo negativa nos grupos infectados e tratados.

5.2. Peso do Coração

Figura 3. Peso cardíaco, expresso em mg, de ratas Wistar fêmeas prenhas controles infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

Os grupos analisados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados.

5.3. Peso do Baço

Figura 4. Peso do baço, expresso em mg, de ratas Wistar fêmeas infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, $n = 5$ animais / grupo experimental.

A comparação entre os grupos controles não mostrou diferença estatisticamente significativa. Os grupos infectados e tratados apresentaram valores semelhantes ao grupo infectado sem tratamento.

5.4. Contagem de macrófagos

Figura 5. Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mL, de ratas Wistar fêmeas controles (não infectadas) e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média ± d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental. Letras diferentes sinalizam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.

Nos grupos controles (sem infecção), as fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA) apresentaram um aumento significativo no número de macrófagos quando comparadas ao grupo das fêmeas controles sem tratamento (PC).

5.5. Proliferação de Esplenócitos

5.5.1. Grupos Controles (sem infecção) e Infectados

Figure 6. Proliferação de esplenócitos, induzidos ou não por ConA (4µg/mL), de ratas Wistar controles (não infectadas), e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental. Letras diferentes sinalizam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.

Nos grupos controles (sem infecção), o tratamento com zinco aumentou a proliferação de esplenócitos nas fêmeas prenhas (sem ConA) quando comparado ao grupo sem tratamento. Os animais prenhes tratados com arginina apresentaram um aumento estatisticamente significativo na proliferação de esplenócitos induzida e não induzida por ConA.

Nos grupos infectados, o tratamento das fêmeas prenhas com zinco induziu um aumento significativo na proliferação celular (com e sem ConA) quando comparado ao grupo das fêmeas prenhas infectadas e sem tratamento.

5.6. Produção de Nitrito por Macrófagos Peritoneais

5.6.1. Grupos Controles (sem infecção) e Infectados

Figura 7. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratas Wistar prenhas controles (não infectadas) e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, $n = 5$ animais / grupo experimental. Letras diferentes sinalizam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.

Os grupos das fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco e arginina apresentaram um aumento na produção de NO (com e sem LPS) quando comparados ao grupo infectado sem tratamento.

5.7. Dosagem de Corticosterona

Figura 8. Concentrações de corticosterona (ng/mL) determinadas no plasma de ratas Wistar prenhas controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental. Letras diferentes sinalizam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.

As fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina apresentaram redução significativa nos níveis de corticosterona plasmática.

5.8. Dosagem de IL-2

Figura 9. Concentrações de IL-2 (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

5.9. Dosagem de INF- γ

Figura 10. Concentrações de INF- γ (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

As concentrações de INF- γ no soro das fêmeas prenhas infectadas apresentaram valores aumentados quando comparados as fêmeas prenhas controles. Entretanto o tratamento com zinco ou arginina das fêmeas infectadas não produziu alteração significativa nos níveis de INF- γ .

5.10. Dosagem de TNF- α

Figura 11. Concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

A concentração de TNF- α no soro de ratas prenhas infectadas e tratadas com zinco apresentou valor aumentado quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.

5.11. Dosagem de TGF- β

Figura 12. Concentrações de TGF- β (pg/mL) determinadas no soro de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

As concentrações de TGF- β no soro das ratas controles e infectadas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados.

5.12. Número de Fetos das Fêmeas Prenhas Controles e Infectadas pela Cepa Y de *T. cruzi*

As Tabelas 1 e 2 mostram o número de fetos das fêmeas prenhas pertencentes aos grupos controles e aos grupos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, respectivamente.

Tabela 1. Número de fetos das fêmeas prenhas controles, nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA).

Grupos Experimentais	Nº de fetos
PC	50
PCZ	54
PCA	54
Total	158

Tabela 2. Número de fetos das fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA).

Grupos Experimentais	Nº de fetos
PI	46
PIZ	53
PIA	50
Total	149

5.13. Resultados Morfológicos

5.13.1. Peso Placentário

Figura 13. Peso das placentas de ratas Wistar prenhas controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, $n = 5$ animais / grupo experimental. Letras diferentes sinalizam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.

Os pesos das placentas dos animais infectados e tratados mostraram valores aumentados, sendo a diferença estatisticamente significativa no grupo tratado com L-arginina.

5.13.2. Diâmetro Placentário

Figura 14. Diâmetro das placentas de ratas Wistar prenhas controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

Os diâmetros das placentas dos animais infectados e tratados não mostraram valores com diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

5.13.3 Comprimento fetal

Figura 15. Comprimento dos fetos de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental.

Os comprimentos dos fetos dos animais infectados e tratados não mostraram valores com diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

5.13.4. Peso fetal

Figura 16. Peso dos fetos de ratas Wistar controles e infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas tratadas com zinco (PCZ), Fêmeas prenhas tratadas com L-arginina (PCA); Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA). Os resultados do gráfico são expressos em média ± d.p.m, n = 5 animais / grupo experimental. Letras diferentes sinalizam diferença estatística significante, $p < 0,05$.

A comparação estatística não mostrou diferenças significantes entre os grupos controles estudados.

Os tratamentos das ratas prenhas infectadas com zinco ou arginina produziram um aumento significativo no comprimento fetal, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento.

5.14. Resultados Histológicos

5.14.1. Intensidade do Parasitismo Cardíaco

Tabela 3. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 15º dia da infecção e 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Para cada grupo experimental n = 5.

Grupos experimentais	Nº de ninhos de amastigotas (Média do grupo)
PI	22
PIZ	8
PIA	3,4

Os grupos infectados e tratados com zinco e arginina apresentaram redução significativa no número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, nos cortes histológicos analisados (200 cortes histológicos / grupo). O tratamento com arginina foi mais eficaz na redução do parasitismo cardíaco.

5.14.2. Intensidade do Parasitismo Placentário

Tabela 4. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas nas placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 15º dia da infecção e 18º dia de prenhez, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina (PIA). Para cada grupo experimental n = 5.

Grupos experimentais	Nº de ninhos de amastigotas (Média do grupo)
PI	6
PIZ	6,5
PIA	7,2

Os exames histológicos das placentas das fêmeas infectadas e tratadas com zinco e arginina mostraram resultados semelhantes ao grupo infectado sem tratamento.

5.14.3. Intensidade do Parasitismo Fetal

Foram analisados microscopicamente todos os cortes histológicos dos fetos provenientes das fêmeas infectadas dos diferentes grupos experimentais estudados e não foram observados parasitas nos tecidos fetais.

5.14.4. Histopatologia do Coração

5.14.4.1. Grupo Infectado sem tratamento (PI)

Figura 17. Aspecto histológico do coração de ratas Wistar prenhas infectadas sem Tratamento (PI) (15º dia da infecção). Hematoxilina e eosina (400x).

5.14.4.2. Grupo infectado e tratado com sulfato de zinco (PIZ)

Figura 18. Aspecto histológico do coração de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com sulfato de zinco (PIZ) (15º dia da infecção). Hematoxilina e eosina (400x).

5.14.4.3. Grupo Infectado e tratado com L-arginina (PIA)

Figura 19. Aspecto histológico do coração de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA) (15º dia da infecção). Hematoxilina e eosina (400x).

5.14.5. Histopatologia da Placenta

5.14.5.1. Grupo Infectado sem tratamento (PI)

Figura 20. Fotomicrografias da camada decídua da placenta do animal infectado sem tratamento (PI), mostrando grandes ninhos de amastigotas. HE (100x e 400x).

Figura 21. Fotomicrografias dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*, sem tratamento. As fotos mostram presença de amastigotas na região decídua e presença de infiltrado inflamatório. HE (400x).

5.14.5.2. Grupo infectado tratado com sulfato de zinco (PIZ)

Figura 22. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com sulfato de zinco (PIZ). As fotos mostram presença de ninho de amastigotas na região decídua. HE (400x e 1000x).

Figura 23. Fotomicrografia da placenta de rata Wistar prenha infectada pela cepa Y de *T. cruzi* e tratada com sulfato de zinco (PIZ). Notar presença de ninho de amastigota no interior de célula gigante. HE (400x).

5.14.5.3. Grupo infectado tratado com L- Arginina (PIA)

Figura 24. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com L-arginina (PIA). As fotos mostram presença de ninhos de amastigotas na região decídua da placenta. HE (400x).

Figura 25. Aspecto histológico da placenta do animal infectado e tratado com L-arginina (PIA), mostrando amastigotas. HE (400x).

6. DISCUSSÃO

A arginina, considerada um dos aminoácidos mais versáteis do organismo, devido a sua gama de funções e participação em diversas moléculas vitais, mostrou efeito benéfico no crescimento fetal-placentário em camundongos cuja alimentação foi suplementada por L-arginina, no último terço da gestação (GREENE, 2012).

A arginina serve como um precursor para a síntese de moléculas biologicamente importantes, tais como ornitina, prolina, poliaminas, creatinina e óxido nítrico (WU & MORRIS, 1998). Além disso, pode regular muitas vias metabólicas que são vitais para a reprodução, crescimento e saúde (JOBGEN et al., 2006). A arginina também tem um papel essencial no desenvolvimento placentário e fetal (WU et al., 2004).

HEFLER et al. (2001) mostraram que camundongos knockout para a óxido nítrico sintase (iNOS) endotelial apresentavam elevada mortalidade de embriões e reduzido crescimento intra-uterino.

A inibição da iNOS, durante a prenhez, reduz a sobrevida e o crescimento embrionário/fetal em ratos (CELADILLA et al., 2005; DIAZ et al., 2005; CHWALISZ et al., 1999). Por outro lado, a suplementação com arginina melhora a sobrevida e o desenvolvimento de embriões e fetos, possivelmente via óxido nítrico (XIANGFANG et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que as placentas e os fetos de ratas prenhas infectadas por *T. cruzi* e tratadas com L-arginina, apresentaram significativo aumento no peso quando comparado ao grupo sem tratamento.

LASSALA et al. (2010), estudando a administração parenteral de L-arginina em ovelhas, verificou que tal suplementação alimentar preveniu a restrição de crescimento fetal e sugeriu que seu uso poderia ser indicado em humanos. GREENE et al. (2012) observaram, ainda, um aumento significativo no crescimento fetal de camundongos, cuja alimentação foi suplementada com L-arginina, o que mais uma vez, concordam com os nossos resultados.

A produção de óxido nítrico (NO) a partir da arginina foi identificada em células endoteliais e em macrófagos por IGNARRO et al. (1987) e HIBBS et al. (1988), respectivamente; a arginina é o único substrato para a produção de NO.

Nossos resultados mostraram que o tratamento das fêmeas prenhas infectadas e tratadas com arginina provocou um aumento na produção de NO quando comparado aos animais infectados sem tratamento.

Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) induz a formação de NO em grande quantidade e este, em condições fisiológicas, apresenta um papel importante na morte de parasitas, bactérias, vírus, células cancerosas e também produz vasodilatação (BOGDAN, 2001). Arginase 1 gera ornitina e uréia. A ornitina é precursora de diferentes produtos, incluindo poliaminas e prolina, e assim pode exercer um importante papel na proliferação celular (BRONTE et al., 2003) e na cura de ferimentos (MANDAL, 2006; BRONTE & ZANOVELLO, 2005).

Citocinas pró-inflamatórias clássicas como IL-1, TNF- α , IFN- γ e IL-12 induzem iNOS. Por outro lado, citocinas antiinflamatórias humorais como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β induzem a expressão da arginase 1 (BRONTE & ZANOVELLO, 2005; HOLAN et al., 2006; CHATTERJEE et al., 2006). A indução da iNOS exerce um efeito regulatório sobre a atividade da arginase 1 através da produção de hidroxil-L-arginina, produto intermediário na produção do NO. A arginase 1, por sua vez, regula a produção de NO através da diminuição da disponibilidade da arginina (MORRIS, 2004; MORRIS, 2007).

Em nosso experimento os grupos infectados e tratados com arginina apresentaram um aumento na concentração de NO, indiretamente corroborando com os dados descritos anteriormente.

Além disso, linfócitos T dependem da arginina para diversas funções biológicas incluindo proliferação e desenvolvimento de memória (OCHOA et al., 2001; OCHOA & MAKARENKOVA, 2005). Os nossos dados mostraram uma proliferação de esplenócitos mais acentuada somente nos grupos controles estimulados ou não com concanavalina A.

O curso da doença de Chagas pode ser intensamente influenciado pelo equilíbrio do sistema imuno-endócrino (SAVINO et al., 2007). Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias ativam o eixo hipófise-hipotálamo-adrenal (HPA), causando elevação na produção de glicocorticóides na circulação (corticosterona em roedores e cortisol em humanos), os quais estão associados à imunossupressão observada durante a doença. Nossos resultados mostraram que a administração de arginina nas fêmeas prenhas infectadas causou redução nos níveis de corticosterona

plasmática.

O zinco é um oligoelemento que possui importante papel na modulação da resposta imune em diferentes hospedeiros. Diversos estudos descreveram o efeito protetor do zinco em uma variedade de infecções, incluindo aquelas causadas por bactérias, vírus e parasitas (PUERTOLIANO et al., 2011). Também é um elemento traço essencial para todos os seres vivos, importante para muitas funções fisiológicas como crescimento, desenvolvimento e reprodução (VALLEE & FALCHUK, 1993), além de ser essencial para o desenvolvimento embrionário e fetal durante a prenhez (SIMMER & THOMPSON, 1985).

Em razão da importância do zinco para a manutenção da homeostasia do sistema imune, neste projeto avaliamos o possível efeito imunomodulador do zinco durante a infecção experimental por *T. cruzi*, bem como determinamos os parâmetros imunológicos e endócrinos durante o período gestacional em fêmeas prenhas infectadas e submetidas à terapia com este elemento.

No tocante à parasitemia, o tratamento com zinco induziu uma redução significativa nos níveis de parasitas sanguíneos (8º dia após a infecção) e teciduais. Corroborando com estes estudos, BRAZÃO et al. (2008) demonstraram que o zinco desempenha função importante no direcionamento e desenvolvimento da resposta imune, limitando a replicação do parasito, fato este evidenciado pela redução significativa da parasitemia sanguínea e tecidual em ratos machos infectados e suplementados com este elemento. Tais estudos também ressaltam a importância deste elemento como fundamental no desenvolvimento da resistência e na prevenção de danos teciduais em ratos infectados por *T. cruzi*.

Estudos sobre os efeitos do zinco demonstram que este está envolvido na redução do estresse oxidativo e inibição da apoptose (TRUONG-TRAN et al., 2000; YOUSEF et al., 2002). A deficiência de zinco, observada em mulheres grávidas e recém nascidos, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, pode alterar o desenvolvimento fetal e pós-natal (VALLEE & FALCHUK, 1993; SANDSTEAD, 1995). Trabalhos pioneiros de HURLEY & SWENERTON (1966) já alertavam que o déficit de zinco teria uma ação teratogênica para mamíferos. Os autores demonstraram que ratas prenhas que recebiam dieta deficiente de zinco (1mg

zinco/g) apresentavam um número baixo de fetos vivos por ninhada e os fetos sobreviventes se caracterizavam por baixo peso corporal e múltiplas anormalidades esqueléticas e teciduais. Tais efeitos teratogênicos da deficiência de zinco, durante a gestação, foram observados em diferentes espécies tais como ratos, camundongos, porcos, ovelhas e macacos (ROGERS et al., 1985; KEEN & HURLEY, 1989). Nossas pesquisas são complementares a estes dados, pois os pesos e comprimentos dos fetos provenientes de ratas infectadas e tratadas com sulfato de zinco apresentaram valores aumentados, quando comparados aos fetos controles, indicando que o tratamento com zinco contribuiu para um melhor desenvolvimento fetal.

FRAKER et al. (1982) mostraram que camundongos com deficiência de zinco ficam mais suscetíveis a patógenos, inclusive *T. cruzi*. Esta deficiência pode ocasionar a morte de animais infectados devido a alterações do sistema imune, com o comprometimento da função de células T, levando a redução da atividade de células NK bem como a capacidade de fagocitose de monócitos e macrófagos.

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito. Quando ativados, liberam óxido nítrico (NO) que está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, tais como relaxamento da musculatura lisa vascular, agregação de plaquetas e neurotransmissão (MONCADA et al., 1991; MONCADA & HIGGS, 2006). É uma molécula efetiva contra patógenos intracelulares, tais como *T. cruzi*, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA & ZILBERSTEIN, 2002; AKAMINE et al., 2007; MARCACCINI et al., 2007). NO mostrou-se altamente citotóxico contra as formas amastigotas de *T. cruzi* (THOMSON et al., 1999). Estudos de BRAZÃO et al. (2008) demonstraram um aumento significativo nas concentrações de NO em ratos machos infectados com *T. cruzi* e tratados com zinco. Em concordância com o descrito, nossos resultados mostraram que as fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco apresentaram um aumento na concentração de óxido nítrico a partir de células peritoneais.

Durante o curso da doença de Chagas, as populações de linfócitos passam por uma série de alterações em sua dinâmica, incluindo expansão, diferenciação, morte e migração. Uma intensa supressão da resposta linfoproliferativa à mitógenos

e a antígenos, incluindo os do parasita, ocorre durante a fase aguda da infecção (KIERSENBAUM & SZTEIN, 1994). Entretanto os mecanismos que causam ausência de resposta ainda não se encontram bem entendidos.

Segundo ABRAHAMSOHN & COFFMAN (1995), durante a fase aguda da doença de Chagas experimental a habilidade das células infectadas por *T. cruzi* progressivamente perdem sua capacidade de proliferação quando estimuladas com antígenos parasitários ou mitógenos. BRAZÃO et al. (2009) descreveram que os animais não suplementados com zinco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, mostraram uma reduzida resposta proliferativa. De forma contrária, a suplementação de zinco produziu um efeito estimulatório sobre a proliferação de esplenócitos e timócitos, consequentemente controlando a replicação parasitária. Esses resultados corroboram com os nossos dados, em que as fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco revelaram um aumento na proliferação de esplenócitos com ou sem a adição de Concanavalina A.

Os resultados obtidos até o momento, referentes ao efeito da terapia de zinco em fêmeas prenhas durante a infecção chagásica, demonstraram modificações importantes na resposta imunológica, contribuindo para a prevenção das lesões observadas durante a doença.

Em relação ao parasitismo tecidual, nossos resultados mostraram uma redução significativa no número de ninhos de amastigotas no coração das fêmeas infectadas e tratadas com zinco e L-arginina, quando comparadas ao grupo infectado sem tratamento. O tecido placentário também apresentou parasitismo tecidual semelhante quanto comparado ao grupo controle.

Várias hipóteses podem ser aventadas na tentativa de se esclarecer a presença de amastigotas no tecido placentário.

ABBASI et al. (2003) demonstraram que o protozoário *Toxoplasma gondi* também pode invadir e se multiplicar em células trofoblásticas. Segundo esses autores, a afinidade do parasita, bem como o sucesso de sua invasão nas células trofoblásticas, permanece pouco esclarecido. Contudo, o ambiente placentário é rico em IL-10, que promove a resposta imunológica do tipo Th2, de extrema importância para o desenvolvimento fetal e tolerância materna, mas por outro lado, pode contribuir para a infecção parasitária na placenta (KEMMERLING et al., 2010).

O fato de encontrarmos ninhos de amastigotas na placenta dos animais

infectados sob terapia com zinco e L-arginina pode ser explicada baseando-se no critério de resposta imunológica. Sabemos que durante a gravidez, a tolerância materno-fetal encontra-se sob um tênue limite, onde a dominância de uma resposta Th2 está presente como fator imprescindível para a manutenção do desenvolvimento fetal. Dessa maneira, um ambiente rico em IL-10 seria um fator altamente sugestivo para o estabelecimento de *T. cruzi* na placenta dos animais infectados (ALONSO-VEGA et al., 2005).

GANGNEUX et al. (2011) relatam que a indução da resposta Th2 para assegurar a gravidez, contribui significativamente para replicação de *T. gondii*. Os mesmos autores ainda descrevem que o equilíbrio imunológico durante a prenhez é fundamental na proteção do feto, porém encontra-se reduzido em consequência à tolerância materno-fetal. As teorias acima descritas podem indiretamente confirmar nossos resultados em relação à presença de ninhos de amastigotas no tecido placentário.

Apesar da presença de ninhos de amastigotas no tecido placentário, não foram encontrados parasitas nos cortes histológicos dos fetos provenientes de fêmeas infectadas e tratadas com zinco e arginina.

Diversos estudos demonstram que a fagocitose placentária é um dos fatores que impedem a transmissão de cepas patogênicas para o feto (MOR et al., 2003; SOUTHCORBE et al., 2011; KIM et al., 2012). A competência imunológica dos tecidos placentários também é um fator importante na doença de Chagas congênita experimental (CARLIER, 2005; DUASO et al., 2012).

É de conhecimento que a transmissão congênita da doença de Chagas é o produto de uma interação complexa entre resposta imune materna, fatores placentários e características da população do parasita (CARLIER, 2005; BURGOS, et al., 2007).

A placenta ainda é responsável pela síntese de hormônios, peptídeos e esteróides que são fundamentais para o sucesso da gravidez (SYME et al., 2004). O fato das placentas provenientes de animais que receberam suplementação de ambas as substâncias, apresentarem ninhos de amastigotas, e os fetos estarem negativos, não representa surpresa. A existência de crianças recém-nascidas não infectadas, filhas de mães chagásicas, ocorre e este fato se deve a uma ativação da resposta imune inata com produção de elevadas concentrações de citocinas pró-

inflamatórias (IL1- β , IL-6, TNF- α) bem como anti-inflamatórias (IL-10) por monócitos (HERMANN et al., 2004; CARLIER, 2005; TRUYENS et al., 2005; HERMANN et al., 2006). Esses trabalhos diretamente corroboram com nossos dados, onde a administração de uma ou ambas as substâncias proporcionou uma resposta Th1 mais efetiva, provavelmente impedindo a passagem do parasita para os tecidos fetais.

Outro fato importante a ser considerado é que mães capazes de transmitir a infecção ao feto apresentam alta parasitemia, diminuição da capacidade de produzir IFN- γ e inabilidade de induzir a produção de IL-2 como uma resposta específica ao parasita (HERMANN et al., 2004; CARLIER, 2005; ALONSO-VEGA et al., 2005). Ao contrário, mães não transmissoras apresentam altos níveis de ativação de monócitos (CARLIER, 2005; ALONSO-VEGA et al., 2005; HERMANN et al., 2006) bem como altas concentrações de TNF- α (GARCIA et al., 2008). Mais uma vez os trabalhos anteriormente citados corroboram com os nossos resultados onde foi observado aumento da proliferação celular induzida por Con A, bem como elevação das concentrações de TNF- α .

CARRARO-ABRAHÃO et al. (2003) mostraram que a cepa RAL de *T. cruzi* possui alta capacidade de penetração no tecido placentário de camundongos, com intenso parasitismo placentário, alcançando as três camadas da placenta, com envolvimento da porção materna e fetal, e também células gigantes e espongioblastos.

MENEGUETTE (1997) observou diferenças no parasitismo placentário produzido por diferentes cepas de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção em camundongos. Animais infectados pela cepa Bolívia e RC de *T. cruzi* apresentaram alto tropismo pelas células da placenta do camundongo, enquanto fêmeas infectadas com a cepa Y apresentaram menor parasitismo placentário. Vários fatores estão envolvidos no comportamento biológico de diferentes cepas, entre eles a forma do tripomastigota sanguícola predominante na população do parasita, o tropismo tecidual e também características genéticas do parasita e tipo de hospedeiro.

Em nosso experimento, o tropismo da cepa Y tanto para o coração como para a placenta corroboram com os dados previamente apresentados por MENEGUETTE (1997).

Assim, entendemos que a administração de oligoelementos como terapia alternativa, no curso da doença de Chagas, pode minimizar as agressões quando comparada às terapias clássicas, cujos efeitos teratogênicos são sabidamente conhecidos na gestação.

7. CONCLUSÃO

A administração de zinco e L-arginina contribuiu de forma eficaz na modulação da resposta imune do hospedeiro, direcionando esta resposta para um padrão TH1, diminuindo o parasitismo sanguíneo e cardíaco.

O tratamento com zinco e arginina ocasionou um aumento significativo nos parâmetros imunológicos promovendo aumento da proliferação de esplenócitos e das concentrações de NO, além do peso e comprimento dos fetos.

Dessa forma, podemos sugerir que a suplementação com estes elementos pode ser utilizada como terapia alternativa imuno-moduladora e, juntamente com a terapia específica anti-parasitária, minimizar as agressões do parasita ao hospedeiro, evitando a administração por longos períodos das drogas tripanocidas que sabidamente possuem sérios efeitos colaterais e teratogênicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. *et al.* Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, v.188, p.608–616, 2003.

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

AFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BULKESTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS JR, L.E.; FORNACIARI, G.; ALISSON, A.A. 9,000-years record of Chagas disease. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.101, p.2034-2039, 2004.

AKAMINE, M.; HIGA, F.; HARANAGA, S.; TATEYAMA, M.; MORI, N.; HEUNER, K.; FUJITA, J. Interferon-gamma reverses the evasion of Birc1e/Naip5 gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin. **Microbiol. Immunol.**, v.51, p.279-287, 2007.

ALEXANDER, J.; STIMSON, W.H. Sex hormones and the course of parasitic infection. **Parasitol. Today**, v.4, p.189-193, 1988.

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v.64, p.1961-1967, 1996.

ALLEN, P.C. Effects of daily oral doses of L-arginine on coccidiosis infections in chickens. **Poultry Sci.**, v.78, p.1506–1509, 1999.

ALONSO-VEGA, C.; HERMANN, E.; TRUYENS, C.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.C.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. Immunological status of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, Supl 2, p.101-104, 2005.

ALTUN, Z.S.; UYSAL, S.; GUNER, G.; YILMAZ, O.; POSACI, C. Effects of oral L-arginine supplementation on blood pressure and asymmetric dimethylarginine in stress-induced preeclamptic rats. **Cell Biochem. Funct.**, v.26, p.648-653, 2008.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Rev. Pat. Trop.**, v.3, p.65-121, 1974.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Bahia**, v.70, p.32-42, 1970.

ARTEAGA-FERNANDEZ, E.; BARRETO, A.C.P.; IANNI, B.M.; VIANNA, C.B.; MADY, C.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Influência da transmissão congênita na doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.49, p.47-49, 1987.

AZOUGUE, E. Women and congenital Chagas` disease in Santa Cruz, Bolívia: epidemiological and sociocultural aspects. **Soc. Sci. Med.**, v.37, p.503-511, 1993.

AZOGUE, E.; DARRAS, C. Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas en recién nacidos con infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz - Bolivia). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.24, p.105-109, 1991.

BADRA, E.S.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; PRADO JÚNIOR, J.C.; ALBUQUERQUE, S.; ZULOCOLOTO, S.; CARRARO-ABRAHÃO, A.A. Histopathological changes in the placentas and fetuses of mice infected with *Trypanosoma cruzi* isolated from the *Myotis nigricans nigricans* bat. **J. Comp. Pathol.**, v.139, p.108-112, 2008.

BARRINGTON, J.W.; LINDSAY, P.; JAMES, D.; SMITH, S.; ROBERTS, A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.103, p.130–132, 1996.

BATES, J.H.; YOUNG, I.S.; GALWAY, I.; TRAUB, A.I.; HADDEN, D.R. Antioxidant

status and lipid peroxidation in diabetic pregnancy. **Br. J. Nutr.**, v.78, p.523–532, 1997.

BEAUMIER, L.; CASTILLO, L.; YU, Y.M.; AJAMI, A.M.; YOUNG, V.R. Arginine: new and exciting developments for an “old” amino acid. **Biomed. Environ. Sci.**, v.9, p.296-315, 1996.

BERNARD, E.T.; GOODMAN, A.L.; GRASSIAN, V.H. Spectroscopic study of nitric acid and water adsorption on oxide particles: enhanced nitric acid uptake kinetics in the presence of adsorbed water. **J. Phys. Chem.**, v.26, p.6443–6457, 2001.

BITTENCOURT, A.L. Doença de Chagas e gravidez. **Bol. Grupo Estudos Cardiop. Gravidez**, v.3, p.3-14, 1988.

BITTENCOURT, A.L. Transmissão vertical da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. 2ed, **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000a. Cap.2, p.16-20.

BITTENCOURT, A. L. Mecanismos de transmissão. In:_____. **Infeções congênitas transplacentárias**. Rio de Janeiro: Revinter, 2000b. Cap.3, p.9-13.

BLANCO, S. B.; SEGURA, E. L. Infección chagásica en embarazadas, aspectos obstétricos y perinatales. Infección cannatal, estrategia para la detección niños infectados congenitamente. **Medicina (B. Aires)**, v.55, p.26, 1997.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunol.** v.2 p.907-916, 2001.

BORMAN, A.; WOOD, T.R.; BLACK, H.C.; ANDERSON, E.G.; OESTERLING, M.J.; WOMACK, M.; ROSE, W.C. The role of arginine in growth with some observations on the effects of argininic acid. **J. Biol. Chem.**, v.166, p.585–594, 1946.

BRAZÃO, V.; CAETANO L.C.; DEL VECCHIO FILIPIN, M.; SANTELLO, F.H.; ALONSO TOLDO, M.P.; PRADO JC, JR. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc

supplementation in the immune response during the course of experimental disease. **Exp. Parasitol.**, v.121, p.105-109, 2009.

BRAZÃO, V.; FILIPIN, M.D.V.; CAETANO, L.C.; TOLDO, M.P.; CAETANO, L.N.; PRADO JR., J.C. *Trypanosoma cruzi*: the effects of zinc supplementation during experimental infection. **Exp. Parasitol.**, v.118, p.549–554, 2008.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.4, p.398-396, 1962.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.59, p.19-26, 1965.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. trop.**, v.5, p.220-224, 1963.

BRITO, M.M.; PIRES, M.Q.; PACHECO, R.S. Chagas disease and HIV coinfection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastide Biology and Disease**, v.2, p.1-7, 2003.

BRITTENDEN, J.; PARK, K.G.M.; HEYS, S.D.; ROSS, C.; ASHBY, J.; AH-SEE, A.K.; EREMIN, O. L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer. **Surg.**, v.115, p.205–212, 1994.

BRONTE, V.; SERAFINI, P.; MAZZONI, A.; SEGAL, D. M.; ZANOVELLO, P. Arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. **Trends Immunol.**, v.24, n.6, p.301-305, 2003.

BURK, R.F.; HILL, K.E. Orphan selenoproteins. **Bio. Essays**, v.21, p.231–237, 1999.

CALDEIRA, J.C.; FRANCI, C.R. Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. **Brain Res. Bull.**, v.52, p.483–489, 2000.

CAMARGOS, E.R.S.; FRANCO, D.J.; GARCIA, C.M.M.G.; DUTRA, A.P.; TEIXEIRA

JUNIOR. A.L.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R.S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.62, p.604-612, 2000.

CARLIER, Y. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, p.105-107, 2005.

CARLIER, Y.; TORRICO, F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, p.767–771, 2003.

CARRARO-ABRAHÃO, A.A.; MENEGUETTE, C.; SALA, M.A; LOPES, R.A. Histological and morphometric investigations of changes induced by the RAL strain of *Trypanosoma cruzi* in the mouse placenta. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.39, p.169-176, 2003.

CASTRO, M.A.P.; BERNER, Z. Estudo parasitológico e anatomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, p.233-239, 1985.

CELADILLA, L.F.; RUEDA, M.C.; RODRIGUEZ, M.M. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats: effects on blood pressure, fetal growth and litter size. **Arch. Gynecol. Obstetrics**, v.271, n.3, p.243-248, 2005.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.158-218, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.3, p.219-275, 1911.

CHAGAS, C. Tripanosomiase Americana. Forma aguda da moléstia. **Mem. Inst.**

Oswaldo Cruz, v.8 p.37-65, 1916.

CHAGAS, C. Estado atual da trypanossomíase americana. **Rev. Biol. Hig.**, São Paulo, v. 5, p. 58-64, 1934.

CHANDRA, R.K. Excessive intake of zinc impairs immune response. **JAMA**, v.252, p.1443–1446, 1984.

CHATERJEE, S.; IWAKIRI, Y. *et al.* Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. **PNAS**, v.103, n.52, p.19777-19782, 2006.

CHWALIS, K.C.; GARFIELD, R.E. *et al.* Role of nitric oxide in implantation and menstruation. **Hum. Reprod.**, v.15, p.96-111, 1999.

CORASH, L.; GROSS, E. Subcellular constituents of human placenta. I. Isolation and characterization of lysosomes from term tissue. **Pediatr. Res.**, v.7, p.798-811, 1973.

COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p.31-40, 2009.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, p.S6-S7, 2010.

COUTINHO, M.; DIAS, J.C.P. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência e Tecnol.** v. 16, n. 2, p.11-55. 1999^a.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia. In:_____. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p.33-65.

DIAZ, L.G.; PRIETO, J.G.; CORONEL, P.; GAMAZO, L.E.; GIMENO, M.; ALVAREZ, A.I. Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit

after hyaluronic acid treatment. **Journal of Orthopaedic Research**. v.23, 6, p.1370–1376, 2005.

DOBZYNSKI, W.; TRAFIKOWSKA, U.; TRAFIKOWSKA, A.; PILECKI, A.; SZYMANSKI, W.; ZACHARA, B.A. Decreased selenium concentration in maternal and cord blood in preterm compared to term deliveries. **Analyst**, v.123, p.93-97, 1998.

DOST, C.K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO JUNIOR, J.C. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol. Res.**, v.7, p.609-616, 2002.

EFRON, D.T.; BARBUL, A. Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.1, p.531–538, 1998.

EFRON, D.T.; BARBUL, A. Role of arginine in immunonutrition. **J. Gastroenterol.**, v.35, Suppl. 12, p.20–23, 2000.

ELENKOV, I.J.; IEZZONI, D.G.; DALY, A.; HARRIS, A.G.; CHROUSOS, G.P. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. **Neuroimmunomodulation**, v.12, p.255-269, 2005.

ERLEBACHER, A. Why isn't the fetus rejected? **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, p.590-593, 2001.

EWAN, R.C. Effect of selenium on rat growth, growth hormones and diet utilization. **J. Nutr.**, v.106, p.702-709, 1976.

FAUSTINO, R.; Pérez, L.; Chedraui P.; Chagas disease in pregnancy: a non-endemic problem in a globalized world. **Arch Ginecol. Obstet**. 2010.

FERNANDES, M.C.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: unique strategy that promotes persistence. **Microbiol. Rev.**, v.36, p.734-747, 2012.

FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A.R.; TAM, C.; MORTARA, R.A.; ANDREWS, N.W. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasm membrane repair pathway for cell invasion. **J. Exp. Med.**, v.208, p.909–921, 2011.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.46, n.3, p.265-271, 2000.

FLYN, N.E.; MEININGER, C.J.; HAYNES, T.E; WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. **Biomed. Pharmacother.**, v.56, p.427–38, 2002.

FRAKER, P.J.; CARUSO, R.; KIERSZENBAUM, F. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Nutr.**, v.112, p.1224–1229, 1982.

FRANK, F.; SARTORI, M. J.; ASTEGGIANO, C.; LIN, S.; DE FABRO, S. P.; FRETES, R. E. The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Mol. Pathol.**, v.69, p.144-151, 2000.

FREILIJ, H.; ALTCHER, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin. Infect. Dis.**, v.21, n.3, p.551-5, 1995.

FREILIJ, H.; ALTCHER, J.; STORINO, R. Chagas congenito. In:_____. **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Doyma Argentina, p. 62-80.1994.

FRETES, R.E. The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Mol. Pathol.**, v.69, p.144-151, 2000.

FUKUI, T.; KATAMURA K.; ABE, N.; KIYOMASU, T.; IIO, J.; UENO, H.; MAYUMI, M.; FURUSHO, K.; IL-7 induces proliferation, variable cytokine-producing ability and

IL-2 responsiveness in naive CD4+ T-cells from human cord blood. ***Immunol. Lett.***, v.59, p.21-28, 1997.

GANGNEUX, F.R.; MURAT, J.B.; HIDALGO, F.H.; PINCHART, M.P.B.; GANGNEUX, J.P.; PELLOUX, H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? ***Cell Press.***, v.27, p.530-536, 2011.

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 an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming grow factor-beta. ***Eur. J. Immunol.***, v.2, p.2501-2506, 1992.

GLADYSHEV, V.N.; HATFIELD, D.L. Selenocysteine-containing proteins in mammals. ***J. Biomed. Sci.*** v.6, p.151–160, 1999.

GREENE, J.M.; DUNAWAY, C.W.; BOWERS, S.D.; RUDE, B.J.; FEUGANG, J.M.; RYAN, P.L. Dietary L-arginine supplementation during gestation in mice enhances reproductive performance and Vegfr2 transcription activity in the fetoplacental unit. ***J. Nutr.***, v.3, p.456-460, 2012.

GURTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. ***Emerg. Infect. Dis.***, v.9, n.1, p.29-32, 2003.

HASSAN, J.; REEN, D.J. Human recent thymic emigrants – identification, expansion, and survival characteristics. ***J. Immunol.***, v.167, p.1970-1976, 2001.

HEFLER, L.A.; GRIMM, C.; HEINZE, C.; SCHENEEBERGER, C. IL-1 receptor antagonist gene polymorphism in recurrent spontaneous abortion. ***J. Reprod. Immunol.***, v.58, p.61-67 2001.

HIBBS, M.; MARLLETA, A.; POKSYN, S.; YOON, R.I.D.; LEAF, C.D.; JOHN, S.

Wishnok Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate **Biochem.**, v.27, n.24, p.8706–8711, 1988.

HOEFLER, R. Interações medicamentosas - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos/MS – FTN
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/multimedia/paginacartilha/docs/intMed.pdf>

HOLÁN, V.; PÍNDJÁKIVÁ, J.; KRULOVÁ, M.; NEUIRTH, A.; FRIC, J.; ZAJICOVÁ, A. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. **Transplantation**, v.27, p.1708-1715, 2006.

HOLBEN, D.H.; SMITH, A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, v.99, n.7, p.836–843, 1999.

HRUBÝ, K.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZENBACHER, P.; NOBILIS, M. Potential cancerostatic benfluron is metabolized by peroxidase: in vitro biotransformation of benfluron by horseradish peroxidase. **Gen. Physiol. Biophys.**, v.16, n.4, p.321-327, 1997.

HUERLEY, L.S.; SWENERTON, H. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.123, n.3, p.692-696, 1966.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **PNAS**, v.84, n.24, p.9265-9269, 1987.

IOM (Institute of Medicine). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington, **National Academy Press**; 2000. p.290–291.

IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **J. Nutr.**, v.188, p.1845–1854, 1998.

JOBGEN, W.S.; JOBGENA, S.C.; LIA, H.; MEININGERB, C.J.; WU, G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. **Chem.**, v.851, p.71-82, 2006.

KEHRLI JR., M.E.; NEILL, J.D.; BURVENICH, C.; GOFF, J.P.; LIPPOLIS, J.D.; REINHARADT, T.A. *et al.* Energy and protein effects on the immune system. In: Sejrsen, K.; Hvelplund, T.; Nielsen, M.O. Ed. *Ruminant Physiology*, Academic Publishers, Utrecht, **The Netherlands**, p.455–471, 2006.

KELLEHER, S.L.; LÖNNERDAL, B. Long-Term marginal intakes of zinc and retinol affect retinol homeostasis. **J. Nutr.**, v.131, p.3237–3242, 2001.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas disease: A proposal. **Biol. Res.**, v.43, p.307-316, 2010.

KETTELER, M.; BORDER, W.A.; NOBLE, N.A. Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. **Am. J. Physiol.**, v.267, p.F197–F207, 1994.

KIERSZENBAUM, F.; SZTEIN, M.B. Chagas' disease (American trypanosomiasis). In: KIERSZENBAUM, F. (Ed.). **Parasitic infections and immune system**. San Diego: Academic Press, 1994. p.53-85.

KIRCHHOFF L.V. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). **Adv Parasitol.** v.75, p.1–18, 2011.

LASSALA, A.; FULLER, W.; BAZER, TIMOTHY, A.C.; SUJAY, D.; DUANE, H.K.; SATTERFIELD, M.C.; SPENCER, T.; WU, G. Parenteral administration of L-arginine prevents fetal growth restriction in undernourished ewes. **J. Nutr.**, v.140, n.7, p.1242-1248, 2010.

LEITCH, G.J.; HE, Q. Arginine-derived nitric oxide reduces fecal oocyst shedding in nude mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **Infect. Immun.**, v.62, p.5173–

5176, 1994.

LEITE DE MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. ***Immunol.***, v.77, p.95-99, 1992.

LESOURD, B. Nutrition: a major factor influencing immunity in the elderly. ***J. Nutr. Health Aging***, v.8, p.28–37, 2004.

LEVEILLE, G.A.; FISHER, H. Amino acid requirements for maintenance in the adult rooster. II. The requirements for glutamic acid, histidine, lysine and arginine. ***J. Nutr.***, v.69, p.289-294, 1959.

LUIKING, Y.C.; POEZE, M.; DEJONG, C.H.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N.E. Sepsis: an arginine deficiency state? ***Crit. Care Med.***, v.32, p.2135–2145, 2004.

MACEDO, A. M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implication for the pathogenesis of Chagas disease. ***Parasitol. Today***, v.14, p.119-123, 1998.

MACHADO, F.S. *et al.* Chagas heart disease: report on recent developments. ***Cardiol. Rev.***, v.20, p.53-65, 2012.

MADDEN, H.P.; BRESLIN, R.J.; WASSERKRUG, H.L.; EFRON, G.; BARBUL, A. Stimulation of T cell immunity by arginine enhances survival in peritonitis. ***J. Surg. Res.***, v.44, p.658–663, 1988.

MAKHOUL, I.R.; SAMMOUR, R.N.; DIAMOND, E.; SHOHAT, I.; TAMIR, A.; SHAMIR, R. Selenium concentrations in maternal and umbilical cord blood at 24- 42 weeks of gestation: basis for optimization of selenium supplementation to premature infants. ***Clin. Nutr.***, v.23, p.373-381, 2004.

MALLARD, B.A.; DEKKERS, J.C.; IRELAND, M.J.; LESLIE, S.; SHARIF, K.E.; VANKAMPEN, C.L. Alteration in immune responsiveness during the peripartum

period and its ramification on dairy cow and calf health. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.585–595, 1998.

MANDAL, M.; AIFANTIS, A.; SAWAIL, K.; FERNANDO, A.; VILIMAS, T. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. **Immunol. Reviews**, v.209, p.159-169, 2006.

MARCACCINI, A.; LÓPEZ-PEÑA, M.; BERMÚDEZ, R.; QUIROGA, M.I.; GUERRERO, F.H.; NIETO, J.M; ALEMAÑ, N. Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. **Vet Microbiol.**, v.125, p.232-243, 2007.

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

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

MIHAILOVIC, M.; CVETKOVIC, M.; LJUBIC, A.; KOSANOVIC, M.; NEDELJKOVIC, S.; JOVANOVIC, I.; PESUT, O. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.73, p.47-54, 2000.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **J. Med.**, v.329, p.2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v.176, p.213-254, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology of nitric oxide. **Pharmac. Rev.**, v.43, p.109-242, 1991.

MORRIS JR., S.M. Arginine metabolism: Bound aires of our knowledge. **J. Nutr.**, v.137, p.1602S-1609S, 2007.

MORRIS JR, S.M.; SIDNEY, M. Enzymes of Arginine Metabolism. **J. Nutr.**, v.134, p.2743S-2747S, 2004.

MUHLING, J.; FUCHS, M.; FLECK, C.; SABLLOTZKI, A.; KRULL, M.; DEHNE, M.G.; GONTER, J.; WEISS, S.; ENGEL, J. Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune function *in vitro*. **Amino Acids**, v.22, p.39–53, 2002.

MULAY, S.; BROWNE, C.A.; VARMA, D.R.; SOLOMON, S. Placental hormones, nutrition and fetal development. **Fed. Proc.**, v.39, p.261-265, 1980.

MUNDER, M. Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. **Br. J. Pharmacol.**, v.158, p.638–651, 2009.

MUNOS-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p.301-307, 1992.

NAGAJYOTHI, F.; WEISS, L.M.; SILVER, D.L.; DESRUISSEAU, M.S.; SCHERER, P.E.; HERZ, J. et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v.5, p.953, 2011.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell. Microbiol.**, 2012. doi 10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x.

NANDAKUMARAN, N.; DASHTI, H.M.; AL-SALEH, E.; AL-ZAID, N.S. Transport kinetics of zinc, copper, selenium, and iron in perfused human placental lobule *in vitro*. **Mol. Cell. Biochem.**, v.252, p.91–96, 2003.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.**, v.249, p.347-371, 2000.

NICKELL, S. P.; STRYKER, G. A.; AREVALO, C. Isolation from *Trypanosoma cruzi* infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.**, v.150, p.1446-1457, 1993.

NILSSON, N.; CARLSTEIN, H. Estrogen induces suppression of natural killer cell cytotoxicity and augmentation of polyclonal b cell activation. **Cell. Immunol.**, v.158, p.131-139, 1994.

NODERA, M.; YANAGISAWA, H.; MORIDAIRA, K.; SHIMOGUCHI, Y.; WADA, O. Reevaluation of zinc deficiency models. **Biomed. Res. Trace Elem.**, v.9, p.19-24, 1998.

OCHOA, C.A.; RODRIGUEZ, P.C.; ZEA, A.H.; DESALVO, J. *et. al.* L-Arginine Consumption by Macrophages Modulates the Expression of CD3{zeta} Chain in T Lymphocytes. **J. Immunol.**, v.171, p.1232-1239, 2001.

OCHOA, J.B.; MAKARENKOVA, V.; BANSAL, V. A rational use of immune enhancing diets: when should we use dietary arginine supplementation? **Nutr. Clin. Pract.** v.19, n.3, p.216-225, 2005.

OTEIZA, P.I.; CUELLAR, S.; LÖNNERDAL, B.; HURLEY, L.S.; KEEN, C.L. Influence of maternal dietary zinc intake on in vitro tubulin polymerization in fetal rat brain. **Teratology**, v.41, p.97-104, 1990.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a co stimulatory factor for interferon- γ -induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, p.8676-8680, 1992.

PÉREZ, A.R.; ROGGERO, E.; NICORA, A.; PALAZZI, J.; BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.; BOTTASSO, O.A. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain Behav. Immunity**, v.21, p.890-900, 2007.

PÉREZ-LÓPEZ, F.R.; CHEDRAUI, P. Chagas disease in pregnancy: a non-endemic problem in a globalized world. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v.282, p.595-599, 2010.

PRADO-JÚNIOR, J.C.; LEAL, M.P.; FRANCI, J.A.A.; ANDRADE, H.F.J.; KLOETZEL, J.K. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v.84, n.2, p.100-105, 1998.

PRADO-JUNIOR, J.C. Jr.; Levy, A.M.; Leal, M.P.; Bernard, E.; Kloetzel, J.K. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 85, p. 826-829, 1999.

PRASAD, A.S. Zinc: an overview. **Nutrition**, v.11, p.93-99,1995.

PRASAD, A.S. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.62–68, 2000.

PUERTOLLANO MA.; PUERTOLLANO E.; CIENFUEGOS GA.; PABLO MA. Dietary antioxidants: immunity and host defense. **Curr. Topics Med. Chem.**, p.1752-1766, 2011.

RASSI, A.; RASSI JR, A. *et al.* Doença de Chagas. In: Lopes A.C., ed. Tratado de clinica medica, (2 ed). São Paulo: Editora Roca, 2009. p.4123-34.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v.356, p.233–241, 2000.

RAYMAN, M.P.; BODE, P.; REDMAN, C.W.G. Low selenium status is associated with the occurrence of the pregnancy disease pre-eclampsia in women from the United Kingdom. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.189, p.1343–1349, 2003.

REED, S.G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: **Molecular Approaches to Parasitology**. New York: Wiley-Liss, Inc, p.443-445, 1995.

REYNOLDS, J.V.; DALY, J.M.; SHOU, J.; SIGAL, R.; ZIEGLER, M.M.; NAJI, A. Immunologic effects of arginine supplementation in tumor-bearing and non-tumor-bearing hosts. **Ann. Surg.**, v.211, p.202–210, 1990.

REYNOLDS, J.V.; DALY, J.M.; ZHANG, S.; EVANTASH, E.; SHOU, J.; SIGAL, R.; ZIEGLER, M.M. Immunomodulatory mechanisms of arginine. **Surg.**, v.104, p.142–151, 1988.

ROBERTS, C.W.; SATOSKAR, A.; ALEXANDER, J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. **Parasitol. Today**, v.12, n.10, p.382-388, 1996.

RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, I.; CHUNG, A.; BERLOT, C.H.; ANDREWS, N.M. cAMP regulate Ca^{2+} dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.16754-16759, 1999.

RODRIGUEZ, A.; RIOULT, M.G.; ORA, A.; ANDREWS, N.W. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca^{2+} mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J. Cell. Biol.**, v.129, p.1263–1273, 1995.

ROGERS, J.M.; KEEN, C.L.; HURLEY, S.L. Zinc deficiency in pregnant Long-Evans hooded rats: teratogenicity and tissue trace elements. **Teratology**, v.31, p.89–100, 1985.

ROTTENBERG, M.E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHER, J.; PRETRAY, P.; RUIZ, A. M.; WIGZELL, H.; ORN, A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. ***Immunol. Lett.***, v.45, p.53-60, 1995.

RUSSOMANDO, G.; SÁNCHEZ, Z.; MEZA, G.; GUILLEN, Y. Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. ***Exp. Reviews***, 2010.

SAITO, H; MD; TROCKI, O.; WANG, S.; GONCE, S.J.; JOFFE, S.N.; ALEXANDER, J.W. Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn. ***Arch. Surg.***, v.122, n.7, p.784-789, 1987.

SALGADO, J.A. O centerário de Chagas e a menina Berenice. ***Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*** 75 (1-2), 1980.

SALOMON, C.J. First century of chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. ***J. Pharm. Sci.***, v.101, p.888-894, 2012.

SALTZMAN, B.E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in atmosphere. ***Anal. Chem.***, v.26, n.12, p.1949-1955, 1954.

SANDSTEAD, H.H. Is zinc deficiency a public problem? ***Nutrition***, v.11, p.87-92, 1995.

SANTOS, C.D.; CALDEIRA, J.C.; TOLDO, M.P.A.; PRADO JÚNIOR, J.C. *Trypanosoma cruzi*: effects of repetitive stress during the development of experimental infection. ***Exp. Parasitol.***, v.110, p.96-101, 2005.

SARTORI, M.J.; LINS, S.; FRANK, F.M.; MALCHIODI, E.L.; FABRO, S.P. Role of placental alkaline phosphatase in the interaction between human placental trophoblast and *Trypanosoma cruzi*. ***Exp. Mol. Pathol.***, v.72, p.84-90, 2002.

SARTORI, M.J.; PONS, P.; MEZZANO, L.; LIN, S.; DE FABRO, S.P. *Trypanosoma cruzi* infection induces microfilament depletion in human placenta syncytiotrophoblast. **Placenta**, v.24, p.767-771, 2003.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D.M.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; MONTEIRO, E.S.; PEREZ, A.R.; AOKI, M.D.P.; BOTTASSO, O.; GUINÃZÚ, N.; SILVA-BARBOSA, S.D.; GEA, S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.18, p.107-124, 2007.

SCHENONE, H.; GAGGERO, M.; SAPUNAR, J.; CONTRERAS, M.C.; ROJAS, A. Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.43, p.231-232, 2001.

SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z.E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop.**, v.115, n.1-2, p.14-21, 2010.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol.**, v.22, p.583-588, 2006.

SCHONLAND, S.O.; ZIMMER, J.K.; LOPEZ-BENITEZ, C.M.; WIDMANN, T.; RAMIN, K.D.; GORONZY, J.; WEYAND, C.M. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. **Blood**, v.102, p.1428-1434, 2003.

SCORZA, C.; SCORZA, J.V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the forth and twenty-ninth day after infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.14, p.171-177, 1972.

SEIFRER, E.; RETTURA, G.; BARBUL, A.; LEVENSON, S.M. Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surg.**, v.84, p.224-230, 1978.

SHARQUIE, K.E.; NAJIM, R.A.; FARJOU, I.B. Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.26, p.21-26, 2001.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi*

altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clin. Biol.**, v.20, p.191-201, 1953.

SIMMER, K.; THOMPSON, R.P. Maternal zinc and intrauterine growth retardation. **Clin. Sci.**, v.68, p.395-399, 1985.

SOARES, M.V.; BORTHWICK, N.J.; MAINI, M.K.; JANOSSY, G.; SALMON, M.; AKBARAN IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA⁺ T cells enables preservation of a naive repertoire. **J. Immunol.**, v.161, p.5909–5917, 1998.

SOUZA, A.P.; OLIVEIRA, G.M.; NÈVE, J.; VANDERPAS, J.; PIRMEZ, C.; DE CASTRO, S.L.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; RIVERA, M.T. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. **Exp. Parasitol.**, v.101, p.193-199, 2002.

SOUZA, A.P.; OLIVEIRA, G.M.; VANDERPAS, J.; CASTRO, S.L.; RIVERA, M.T.; ARAÚJO-JORGE, T.C. Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Res.**, v.91, p.51–54, 2003.

STADMAN, T.C. Selenocysteine. Ann. **Rev. Biochem.** v. 65, p. 83–100, 1996.

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

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v.356, p.338-340, 1992.

TAYLOR, R.L.; AUSTIC, R.E.; DIETERT, R.R. Dietary arginine influences Rous sarcoma growth in a major histocompatibility B complex progressor genotype. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.199, p.38-41, 1992.

TERENZI, F.; DÍAZ-GUERRA, M.J.M.; CASADO, M.; HORTELANO, S.; LEONI S.; BOSCA, L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.6017-6021, 1995.

THOMSON, L.; GADILLHA, F.R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A.E.; RADI, R. Peroxynitrite affects Ca²⁺ transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, v.98, p.81-941, 1999.

TOMAT, A.L.; INSERRA, F.; VEIRAS, L.; VALLONE, M.C.; BALASZCZUK, A.M.; COSTA, M.A.; ARRANZ, C. Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.295, p.R543-R549, 2008.

TRUONG-TRAN, A.Q.; HO, L.H.; CHAI, F.; ZALEWSKI, P.D. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. **J. Nutr.** v.130, p.1459S-1466S, 2000.

UYEMURA, S.A.; ALBUQUERQUE, S.; CURTI, C. Energetics of heart mitochondria during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.27, n.11, p.1183-1189, 1995.

VALLEE, B.L.; FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiol. Rev.** v.73, p.79-118, 1993.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Publica**, v.16, p.7-12, 2000.

VIRREIRA, M.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; BRUTUS, L.; JIJENA, J.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.77, p.102-106, 2007.

WISEK, W.J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. **J. Nutr.**, v.116, p.36-46, 1986.

WAKABAYASH, I. Inhibitory Effects of Baicalein and Wogonin on Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Production in Macrophages. **Pharmacol. Toxicol.**, v.84, p.288-291, 1994.

WELLIGHAUSEN, N. Immunobiology of gestacional zinc deficiencie. **Brit. J. Nutr.**, v.2, p.S81-S86, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' Disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1991. p.95. (WHO Tech Rep Ser, v. 811).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas Disease, Brazil. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 2000. n.75, p.153-155. (WHO Wkly. Epidemiol. Rec., v.19).

WU, G.; BAZER, F.W; CUDD, T.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E. Maternal nutrition and fetal development. **J. Nutr.**, v.134, p.2169-2172, 2004.

WU, G.; MORRIS JR., S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem. J.**, v.336, p.1-17, 1998.

YOUSEF, M.I.; EL-HENDY, H.A.; EL-DEMERDASH, F.M.; ELAGAMY, E.I. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. **Toxicol.**, v.175, p.223-234, 2002.

ZACHARA, B.A.; WARDAK, C.; DIDKOWSKI, W.; MACIAG, A.; MARCHALUK, E. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v.35, n.1, p.12-17, 1993.

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J.E. Chagas disease: An ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. **Annu. Rev. Entomol.**, v.26, p.101-133, 1981.

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.193.53.4), intitulado: "Estudo dos Efeitos da Administração de Zinco, Selênio e Arginina na Prenhez de Ratos Wistar Infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*", de autoria de **Ana Amélia Carraro Abrahão**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/04/2009.

Ribeirão Preto, 8 de abril de 2009

Presidente da CEUA em exercício
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro