UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Zinco: Caracterização fenotípica de linfócitos T, e células T reguladoras durante a prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Cássia Mariana Bronzon da Costa

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 11/05/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Zinco: Caracterização fenotípica de linfócitos T, e células T reguladoras durante a prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Cássia Mariana Bronzon da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

Co-orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Ribeirão Preto

2017

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.

Da Costa, Cássia Mariana Bronzon

Zinco: Caracterização fenotípica de linfócitos T, e células T reguladoras durante a prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de Trypanosoma cruzi, 2017. 171p:il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Carraro-Abrahão, Ana Amélia.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Prenhez. 3. Zinco. 4. Caracterização fenotípica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cássia Mariana Bronzon da Costa. **Zinco: Caracterização fenotípica de linfócitos T, e células T reguladoras durante a prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão
Co-orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Ao amor mais puro que pude conhecer que trouxe luz aos meus dias e esperança ao meu coração, ***Murilo****;*

Ao anjo chamado ***Mirella****, um presente que Deus nos deu para amar incondicionalmente;*

A eles, meus sobrinhos amados;

Dedico

“Eis que nas palmas das minhas mãos eu te gravei; os teus muros estão continuamente diante de mim” *(Isaías 49-16)*

“O Senhor te guardará de todo o mal; guardará a tua alma, O Senhor guardará a tua entrada e a tua saída, desde agora e para sempre”

(Salmos 121 7-8)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guiou todos os meus passos, me deu força e coragem durante toda essa caminhada. Agradeço a Ele todo o aprendizado e todos os livramentos que recebi. Ao Senhor meu Deus seja dada toda honra e toda glória.

À minha mãe, ***Luciene Silveira Bronzon da Costa***, por me sustentar em orações e acreditar nos meus sonhos. Suas palavras sempre foram ditas a tempo e a hora quando mais precisei. Obrigada, Mãe.

Ao meu pai, ***José Antônio da Costa***, por se manter por perto apesar da distancia. Suas ligações diárias, sua presença sempre que possível e seus conselhos me fortaleceram no correr dessa jornada. Obrigada por acreditar em mim, em fazer dos meus sonhos os seus. Muito obrigada, Pai.

Aos meus irmãos, por todo o amor que recebo. Muito obrigada!

Ao meu esposo, ***Luiz Miguel Pereira***, que, além disso, é meu colega, professor e melhor amigo. Sem você por perto certamente o resultado deste trabalho não seria o mesmo. Agradeço sua paciência e generosidade comigo. Agradeço sua compreensão e amor durante todo esse tempo...Obrigada, meu amor.

À minha querida orientadora ***Ana Amélia***, por ter confiado em mim e me receber tão gentilmente como aluna. Agradeço a você por todo o aprendizado que me proporcionou e por ser um exemplo diário de honestidade e amor à profissão. Sua

generosidade para conosco jamais será esquecida. Ana, muito obrigada por ter permitido que eu sonhasse e realizasse este sonho. Você mora no meu coração.

À minha querida ***Inara Gallo***, que chegou na minha vida quando mais precisei. Muito obrigada por ter tanta paciência comigo, por me motivar e cuidar de mim. Sou grata a Deus por ter colocado você no meu caminho. Sua atenção, carinho e amor foram fundamentais para que eu me mantivesse com os olhos adiante. Agradeço a sua querida mãe por me receber na sua casa como uma filha e ao querido amigo e padrinho Tavinho por me divertir tanto! Obrigada por tudo!

À querida ***Gisele Bulhões***, minha colega e amiga que muitas vezes alegrou o meu dia e sempre me fez rir muito. Gi, obrigada pelo coleguismo, por sua amizade sincera e por todo o carinho que sempre demonstrou. Obrigada Gi!

Ao querido colega ***Ferdinando de Paula Silva***, pelo companheirismo nesta caminhada. Ferdi, muito obrigada por ser tão prestativo e por toda a confiança em mim depositada. Obrigada Ferdi!

À ***Isabel Cristina Vigato Ferreira***, minha colega de imuno, que sempre confiou tanto em mim e por ter se tornado uma grande amiga. Agradeço todo o apoio, carinho e confiança. Sinto muita saudade do café na copinha e das nossas conversas sempre tão agradáveis... Obrigada, Bel!

À minha amiga ***Michelle Giordana*** que de longe é tão presente. Obrigada por alegrar os nossos dias e torcer por mim desde sempre. Obrigada Mi.

A ***Kássia Caldeira Lopes***, minha doce amiga que sempre me incentivou com palavras encorajadoras, sempre disponível e pronta para servir. Obrigada por tudo, Ninha!

À minha querida amiga ***Rebecca Souto***, por todo amor que recebi. Obrigada por tudo!

À minha madrinha ***Sandra Elizabeth Costa Mongelli***, por me encorajar a ir à luta e me acompanhar de perto desde sempre. Muito obrigada!

Ao Prof. e amigo ***Marley Garcia Silva***, por ter me apresentado os caminhos da ciência e ter acreditado em mim. Obrigada pela motivação e confiança. Muito obrigada, Bob!

Às queridas amigas **Paula** e **Fabiana,** por estarem sempre por perto de coração e vibrarem a cada conquista. Muito obrigada!

Aos docentes do Laboratório de Parasitologia, pela contribuição fundamental.

À ***Fabiana Rosseto de Moraes***, pelas leituras e análises de citometria.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, e toda a equipe de técnicos e secretários pela colaboração.

Aos funcionários da Pós- Graduação, Henrique e Rosana, por todo apoio prestado. Muito obrigada!

De maneira muito especial, meu imenso agradecimento aos animais utilizados na

pesquisa, que inocentemente contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP- USP**, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, Processo: 2013/ 04205-6, pela bolsa de Doutorado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo suporte financeiro.

À **Clic Soluções Gráficas** pela competência e pontualidade na impressão deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

DA COSTA, C. M. B. **Zinco: Caracterização fenotípica de linfócitos T, e células T reguladoras durante a prenhez de ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. 2017. 171f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2017.

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença zoonótica, transmitida pelas fezes do inseto triatomíneo, pertencente à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectas por *T. cruzi* em todo o mundo e 25 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção. Durante a prenhez, a demanda de zinco no organismo é aumentada, razão pela qual as mulheres grávidas são mais suscetíveis a apresentarem déficit deste micronutriente. O zinco é um oligoelemento com função essencial no crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular e sistema imunológico. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do zinco na ativação de diferentes compartimentos do sistema imune em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*. Foram utilizados 4 grupos experimentais: prenhas infectadas sem tratamento (PI), prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ), prenhas controles sem tratamento (PC), prenhas controles tratadas com sulfato de zinco (PCZ). Fêmeas do grupo infectado foram acasaladas trinta dias após a infecção e o tratamento com zinco (20 mg/kg/dia) foi efetuado durante 18 dias. Os animais foram eutanasiados no 18° dia da prenhez (48°dia da infecção). Foram avaliados os seguintes parâmetros: população de macrófagos, produção de nitrito e expressão de RT1B (MHC II) no lavado peritoneal; proliferação de linfócitos (CFSE), perfil apoptótico (anexina V e iodeto de propídeo), expressão fenotípica de linfócitos $CD161^+$, $CD3^+CD161^+$, $TCD3^+CD4^+$, $TCD3^+CD8^+$, expressão de $CD11a^+$, $CD28^+$, células apresentadoras de antígenos $CD11b/c^+$, moléculas coestimulatórias, $CD80^+$,$CD86^+$, linfócito B (CD45RA), células T reguladoras $TCD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^{high}$, perfil de memória $CD62L/CD44^{high}$. Também foram avaliadas citocinas intracelulares produzidas por linfócitos esplênicos (IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e quimiocina MCP-1), citocinas do soro (IL- 2, IL- 4, IL- 6, IL- 10, IL-12, IL- 17, TGF- β, INF-γ e TNF-α), corticosterona plasmática, zinco sérico, e análise molecular de amostras fixadas (coração, placenta e fetos) para detecção de DNA

genômico de *T. cruzi.* Nossos resultados mostraram que o tratamento com zinco aumentou as concentrações de nitrito e expressão de RT1B em macrófagos. Por outro lado, observou-se uma diminuição no perfil de proliferação de esplenócitos e no percentual de células em apoptose. Em relação às populações de linfócitos, o tratamento com zinco diminuiu o percentual de células NKT^+, $TCD4^+$, $TCD8^+$ e Treg. Foi possível observar ainda, uma diminuição na produção de TNF-α e IFN-γ, e aumento de IL-17 e TGF-β. Desta forma, os resultados mostraram que o zinco exerce papel modulador nos diferentes parâmetros imunológicos em ratas prenhas infectadas com *T. cruzi.*

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*; rato; prenhez; zinco; caracterização fenotípica

ABSTRACT

DA COSTA, C. M. B. **Zinc: Phenotypic characterization of T lymphocytes and regulatory T cells during pregnancy of Wistar rats infected with Y strain of *Trypanosoma cruzi*.** 2017. 171f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Chagas disease or American trypanosomiasis is a zoonotic disease, transmitted by the feces of the triatomine insect, belonging to the Reduviidae family, Triatominae subfamily. It is estimated that 8 million people worldwide are infected with *T. cruzi* and 25 million people are under risk of infection. During pregnancy, an increased demand for zinc is observed, reason why pregnant women are more likely to have a deficit in this micronutrient. Zinc is a trace element which plays an essential function during growth, development, cellular differentiation and immune response. Thus, the goal of this study was to evaluate the influence of zinc on the activation of different compartments of the immune system in pregnant Wistar rats infected with *T. cruzi* Y strain. Four experimental groups were used: infected pregnant without treatment (PI) and infected pregnant treated with zinc sulfate (PIZ), pregnant controls without treatment (PC), pregnant controls treated with zinc sulfate (PCZ). Females from infected group were mated 30 days post infection and treatment with zinc (20mg/kg/day) was performed for 18 days. Animals were euthanized on the 18th day of pregnancy (48th day of infection). The following parameters were evaluated: macrophages subsets, nitrite production and RT1B (MHC II) expression in the peritoneal exudate; Lymphocyte proliferation (CFSE), apoptotic profile (annexin V and propidium iodide), phenotype expression of CD161^{+} lymphocytes, CD3^{+} CD161^{+}, TCD3^{+} CD4^{+}, TCD3^{+} CD8^{+}, CD11a^{+}, CD28^{+}, CD11b/c^{+}, CD45RA, TCD3^{+} CD4^{+} CD25^{+} Foxp3^{high} regulatory T cells, CD62L/CD44^{high} memory profile. Intracellular cytokines produced by splenic lymphocytes (IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α and MCP- 1 chemokine), serum cytokines (IL-2, IL-4, IL- 10, IL-12, IL-17, TGF-β, INF-γ and TNF-α), plasma corticosterone, serum zinc, and molecular analysis of fixed samples (heart, placenta and fetuses) for detection of *T. cruzi* genomic DNA. Our results demonstrated that zinc treatment increased nitrite concentrations and RT1B expression in macrophages. On the other hand, there was a decrease in splenocytes proliferation and in the percentage

of apoptosis. Furthermore, zinc therapy decreased the percentage of NKT^+, $TCD4^+$, $TCD8^+$ and Treg cells. Besides, zinc treatment decreases TNF-α and IFN-γ and increase IL-17 and TGF-β production. Indeed, our results demonstrated that actually zinc exerts a modulatory role on the different immune responses as well as cellular subsets from *T. cruzi* infected and pregnant rats.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; rat; pregnancy; zinc; phenotypic characterization.

RESUMEN

DA COSTA, C. M. B. **Zinc: Caracterización fenotípica de linfocitos T y células T reguladoras durante la preñez de ratas Wistar infectadas por cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2017. 171f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto. 2017.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica, transmitida por las heces del insecto triatomíneo, perteneciente a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Estimase que 8 millones de personas estén infectadas por *T. cruzi* en todo el mundo y 25 millones de personas estén bajo el riesgo de infección. Durante el embarazo, la demanda de zinc en el organismo es aumentada. Por lo tanto, mujeres embarazadas son más susceptibles a presentaren déficit de este micronutriente. El zinc es un oligoelemento con función esencial en el crecimiento, desarrollo, diferenciación celular y sistema inmunológico. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la influencia del zinc en la activación de diferentes compartimientos del sistema inmune en ratas Wistar embarazadas infectadas por la cepa Y de *T. cruzi*. Fueron utilizados 4 grupos experimentales: ratas embarazadas infectadas sin tratamiento (PI), ratas embarazadas infectadas tratadas con sulfato de zinc (PIZ), ratas embarazadas controles sin tratamiento (PC), ratas embarazadas controles tratadas con sulfato de zinc (PCZ). Las hembras del grupo infectado fueron fertilizadas treinta días post-infección y el tratamiento con zinc (20 mg/kg/día) fue efectuado durante 18 días. Los animales fueron eutanasiados al día 18 de gestación (al 48 de infección). Fueron evaluados los siguientes parámetros: población de macrófagos, producción de nitrito y expresión de RT1B (MHC II) en el lavado peritoneal, proliferación de linfocitos (CFSE), perfil apoptótico (anexinas V e yoduro de propidio), expresión fenotípica de linfocitos $CD161^+$, $CD3^+CD161^+$, $TCD3^+CD4^+$, $TCD3^+CD8^+$, expresión de $CD11a^+$, $CD28^+$, células presentadoras de antígenos $CD11b/c^+$, moléculas coestimuladoras, $CD80^+$,$CD86^+$, linfocito B (CD45RA), células T reguladoras $TCD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^{high}$, perfil de memoria $CD62L/CD44^{high}$. También fueron evaluadas citocinas intracelulares producidas por linfocitos esplénicos (IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α y quimosina MCP-1), citocinas del suero (IL- 2, IL- 4, IL- 6, IL- 10, IL-12, IL- 17, TGF- β, INF-γ y TNF-α), corticosterona plasmática, zinc sérico y análisis

molecular de muestras fijadas (corazón, placenta y fetos) para detección de ADN genómico de *T. cruzi.* Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con zinc aumentó las concentraciones de nitrito y expresión de RT1B en macrófagos. Por otro lado, se observó una disminución en el perfil de proliferación de esplendorcitos y en el porcentual de células en apoptosis. En relación a las poblaciones de linfocitos, el tratamiento con zinc disminuyó el porcentual de células NKT^+, $TCD4^+$, $TCD8^+$ y Treg. Fue posible observar aún una disminución en la producción de TNF-α e IFN-γ, y aumento de IL-17 y TGF-β. De esa forma, los resultados mostraron que el zinc ejerce papel modulador en los diferentes parámetros inmunológicos en ratas embarazadas infectadas con *T. cruzi.*

Palabras llave: *Trypanosoma cruzi*; rata; embarazo; zinc; caracterización fenotípica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **A -** Estratégia de seleção da população linfocitária de acordo com tamanho e complexidade. **B -** Histograma representativo da proliferação de linfócitos marcados com CFSE. **C -** Gráfico em *dot plot* representativo de células $CD3^+CFSE^+$..... **30**

Figura 2. Avaliação da morte celular por meio da análise da externalilação de resíduos de fosfatidilserina. A figura mostra porcentagem de células viáveis (quadrante inferior esquerdo: Anexina V^- PI^-), células em fase precoce de apoptose (quadrante inferior direito: Anexina V^+ PI^-) e células em fase tardia de apoptos ou em necrosee (quadrante superior direito: Anexina V^+ PI^+). Gráfico em *dot plot* ilustrativo dos diferentes estágios de apoptose..... **32**

Figura 3. Estratégia de aquisição de células apresentadoras de antígenos de acordo com tamanho e complexidade. Gráfico em *dot plot* ilustrativo representa expressão de células CD11b/c e CD11b. O histograma representa expressão de RT1B por células peritoneais..... **34**

Figura 4. **A -** Estratégia de aquisição da população de linfócitos conforme tamanho, complexidade e expressão de $CD3^+$. **B -** Gráfico em *dot plot* representativo das subpopulações de $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$..... **36**

Figura 5. **A -** Estratégia de aquisição da população linfocitária conforme tamanho e complexidade. **B -** Gráfico representativo das populações de células $CD161^+$ (linfócitos NK) e $CD3^+CD161^+$ (linfócitos NKT)..... **37**

Figura 6. **A -** Estratégia de aquisição da população de linfócitos de acordo com tamanho, complexidade e expressão de CD3. **B -** Gráfico em *dot plot* ilustrativo das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$..... **39**

Figura 7. Histogramas representativos das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ produtores de IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e quimiocina MCP-1..... **40**

Figura 8. **A -** Estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com características de tamanho e complexidade. **B -** Gráfico em *dot plot* representativo de linfócitos de acordo com a expressão de CD3. **C -** Gráfico em *dot plot* ilustrativo da subpopulação de linfócitos de acordo com a expressão $CD4^+$ $CD25^+$. **D -** histograma ilustrativo de acordo com a expressão de FOXP3..... **43**

Figura 9. Concentrações de Nitrito (μM) em culturas de células peritoneais estimuladas ou não com LPS (10μg/mL), coletadas de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **49**

Figura 10. Representação gráfica da proliferação basal de esplenócitos marcados com CFSE **(A e B)**; Marcação de células $CD3^+$ provenientes do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* **(C e D)**..... **51**

Figura 11. Marcação de células esplênicas de ratas Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo..... **53**

Figura 12. Marcação de células esplênicas de ratas Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo..... **54**

Figura 13. Marcação de células esplênicas de ratas Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo..... **55**

Figura 14. Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25μg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo..... **56**

Figura 15. Marcação de células esplênicas em cultura, não estimuladas **(A)** ou estimuladas **(B)** com extrato parasitário (25μg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo..... **57**

Figura 16. Células $CD11b/c^+$, obtidas a partir do lavado peritoneal de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **58**

Figura 17. Representação gráfica dos níveis de expressão do antígeno RT1B (MHC classe II, I-A equivalent) em macrófagos obtidos a partir do lavado peritoneal de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **59**

Figura 18. Representação gráfica dos níveis de expressão das moléculas CD80 **(A)** e CD86 **(B)** em células CD11b/c$^+$, obtidas a partir baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **60**

Figura 19. Representação gráfica dos níveis de expressão da molécula CD45RA (marcador de linfócito B) em células obtidas a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **61**

Figura 20. Análise do percentual de células NK **(A)** e NKT **(B)**, obtidas a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **62**

Figura 21. Análise das subpopulações de linfócitos T CD3$^+$CD4$^+$ **(A)** e T CD3$^+$CD8$^+$ **(B)** no baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **63**

Figura 22. Análise do percentual de linfócitos T CD4$^+$CD28$^+$ **(A)**, T CD4$^+$CD11a$^+$ **(B)**, T CD8$^+$CD28$^+$ **(C)** e T CD8$^+$CD11a$^+$ **(D)** em células esplênicas de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **65**

Figura 23. Representação gráfica dos níveis de expressão de FoxP3 nas células T CD4$^+$CD25^{high} obtidas a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **66**

Figura 24. Representação gráfica dos níveis de expressão de CD62L^{low} e CD44^{high} em linfócitos T CD4$^+$ obtidos a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **67**

Figura 25. Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T CD4$^+$ de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **69**

Figura 26. Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T CD8^{+} esplênicos ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **71**

Figura 27. Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD4+ e CD8+ esplênicos de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **72**

Figura 28. Quantificação da citocina IFN-γ no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **73**

Figura 29. Quantificação da citocina TNF-α no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **74**

Figura 30. Quantificação da citocina IL-4 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **75**

Figura 31. Quantificação da citocina IL-10 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **76**

Figura 32. Quantificação da citocina IL-2 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **77**

Figura 33. Quantificação da citocina IL-6 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **78**

Figura 34. Quantificação da citocina IL- 12 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **79**

Figura 35. Quantificação da citocina IL- 17 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **80**

Figura 36. Quantificação da citocina TGF-β no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **81**

Figura 37. Quantificação dos níveis plasmáticos de corticosterona de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **82**

Figura 38. Quantificação dos níveis plasmáticos de zinco de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*..... **83**

Figura 39. Peso e diâmetro placentários **(A e B)** de ratas Wistar prenhas infectadas ou não por cepa Y de *T.cruzi*..... **84**

Figura 40. Peso e comprimento dos fetos **(A e B)** de ratas Wistar prenhas infectadas ou não por cepa Y de *T.cruzi*..... **85**

Figura 41. **Primeira extração de DNA de *T. cruzi* em tecido fixado (placentas).** Extração de DNA de *T. cruzi*..... **86**

Figura 42. **Extração de DNA de *T. cruzi em* tecido fixado (placentas) após tratamento com tampão TE 9.** O DNA de *T. cruzi*..... **87**

Figura 43. A sequencia S35/S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'- AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'- GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). A amostra foi comparada com o PCR sobre o DNA genômico de epimastigotas de *T. cruzi*..... **88**

Figura 44. **Amplificação da sequencia S35 S36 de DNA genômico de *T. cruzi* nas placentas.** A sequência S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'- AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'- GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL)..... **89**

Figura 45. **Amplificação da seqüência S35 S36 de DNA genômico de *T. cruzi* nos tecidos fetais.** A sequencia S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'- AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'- GGGTTCGATTGGGGTTGGTG)..... **90**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos grupos e número de animais utilizados..... **22**

Tabela 2. Anticorpos monoclonais para análise fenotípica de células do lavado peritoneal..... **33**

Tabela 3. Anticorpos monoclonais para análise fenotípica de células esplênicas..... **35**

Tabela 4. Descrição dos marcadores celulares..... **36**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA Oneway analysis of variance

APC Aloficocianina *(Allophycocyanin)*

APCs Células apresentadoras de antígenos

BSA Albumina sérica bovina *(Bovin serum albumin)*

C Controle

CD Designação de grupos *(Cluster of differentiation)*

CFSE Carboxifluoresceína succinil éster *(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)*

ConA Concanavalina A

DNA Ácido Desoxirribonucleico

ELISA *Enzyme Lynked Immunosorbent Assay*

FACS *Fluorescence-activated cell sorting*

FITC Isotiocianato de fluoresceína *(Fluorescein isothiocyanate)*

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

MCP-1 Proteína Quimiotática para monócitos

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

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

NK - Células Natural Killer

NKT Célula natural Killer T

NO - Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NOS - Óxido Nítrico Sintetase

PBS - Tampão Fosfato Salino *(Phosphate-buffered saline)*

PC - Prenhas Controle

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PE - Ficoeritrina *(r-phycoerythrin)*

PECy7- *Phycoerythrinconjugated conjugated with cyanine dye 7*

PI - Prenhas Infectadas

PI - Iodeto de propídeo

PIZ - Prenhas Infectadas Tratadas com Zinco

PMA Forbol-12-miristato-13-acetato *(Phorbol 12-myristate 13-acetate)*

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

WHO - World Health Organization

$ZnSO_4$ - Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

Resumo ix

Abstract ii

Resumen xiii

Lista de Figuras i

Lista de Tabelas vi

Lista de Abreviaturas e Siglas vii

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1 A origem da doença de Chagas: teoria clássica e atual..... 2

1.2 Contexto histórico e a descoberta de Carlos Chagas..... 3

1.3 A doença de Chagas: aspectos epidemiológicos, patogenia e resposta imunológica..... 6

1.4 Doença de Chagas congênita e resposta imune materna..... 9

1.5 ZINCO..... 11

2. OBJETIVOS..... 14

2.1 Objetivo Geral..... 15

2.2 Objetivos Específicos..... 15

3. JUSTIFICATIVA..... 17

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 20

4.1 Animais..... 22

4.2 Grupos Experimentais..... 22

4.3 Infecção..... 23

4.4 Acasalamento..... 23

4.5 Suplementação com Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$)..... 24

4.6 Delineamento experimental..... 24

4.7 Eutanásia e coleta de sangue..... 24

4.8 Parasitemia..... 25

4.9 Obtenção de antígenos de T. cruzi..... 25

4.10 Quantificação de óxido nítrico a partir de células do lavado peritoneal (método de Griess)..... 26
4.11 Preparo da suspensão de células do baço..... 27
4.12 Avaliação da proliferação celular (ensaio de CFSE basal e após cultura de 5 dias) 28
4.13 Análise do processo de apoptose em linfócitos esplênicos..... 30
4.14 Caracterização fenotípica de células do lavado peritoneal por citometria de fluxo..... 32
4.15 Análise fenotípica de células do baço por citometria de fluxo..... 34
4.16 Quantificação das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α, e quimiocina MCP-1..... 37
4.17 Ensaios imunológicos – Dosagens de Citocinas..... 41
4.18 Caracterização fenotípica de células T reguladoras ($CD4^+$ $CD25^+$) conforme da expressão do fator de transcrição forkhead box P3 (FoxP3). 41
4.19 Dosagem de corticosterona..... 43
4.20 Análise dos parâmetros morfológicos (peso e comprimento fetal; peso e diâmetro placentário) 44
4.21 Determinação de zinco sérico em amostras do plasma por HPLC (High Performance Liquid Cromatograph) 44
4.22 Detecção de T. cruzi por PCR..... 45
4.22.1 Extração de DNA de T. cruzi em tecido fixado..... 45
4.22.2 PCR..... 45
4.23 Análise estatística 46

5. RESULTADOS..... 47
5.1 Parasitemia..... 48
5.2 Quantificação de óxido nítrico produzido por células do lavado da cavidade peritoneal..... 48
5.3 Avaliação da proliferação celular (ensaio de CFSE basal e em cultura de 5 dias) 49
5.4 Análise do processo de apoptose e viabilidade celular..... 51
5.5 Análise do percentual de células apresentadoras de antígenos (CD11 b/c+) obtidas a partir do lavado peritoneal..... 57

5.6 Análise da expressão de RT1B em macrófagos peritoneais..... 58
5.7 Análise do percentual de células apresentadoras de antígenos (CD11 b/c+) e expressão de CD80 e CD86..... 59
5.8 Análise do percentual de Linfócitos B (CD45RA^{+})..... 60
5.9 Análise fenotípica do percentual de células NK (CD161^{+}) e NKT (CD3^{+}CD161^{+})..... 61
5.10 Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4^{+} e T CD8^{+}.. 62
5.11 Expressão de moléculas CD28 e CD11a nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+..... 63
5.12 Análise de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3^{high}..... 65
5.13 Análise do fenótipo CD62L^{Low} CD44^{high}..... 66
5.14 Detecção intracelular das citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α em linfócitos T CD4+ e CD8+..... 67
5.15 Produção de MCP-1 por linfócitos esplênicos..... 71
5.16 Quantificação de citocinas no soro de ratas Wistar prenhas nos diferentes grupos experimentais utilizando kits ELISA (IL- 2, IL-4, IL-6, IL-10, IL- 12, IL-17, TNF-α e TGF- β) 72
5.16.1 IFN-γ..... 72
5.16.2 TNF-α..... 73
5.16.3 IL-4..... 74
5.16.4 IL-10..... 75
5.16.5 IL-2..... 76
5.16.6 IL-6..... 77
5.16.7 IL-12..... 78
5.16.8 IL-17..... 79
5.16.9 TGF-β..... 80
5.17 Dosagem de corticosterona plasmática pelo método de ELISA..... 81
5.18 Dosagem de Zinco sérico (HPLC)..... 82
5.19 Análise morfológica..... 83
5.19.1 Peso e diâmetro placentário..... 83
5.19.2 Peso e comprimento fetal..... 84
5.20 Detecção de DNA de T. cruzi em tecido fixado..... 85
5.20.1 Primeira extração de DNA em tecido fixado (placentas)..... 85

5.20.2 Segunda extração de DNA genômico de T.cruzi após tratamento de 24hs em tampão TE (Tris- EDTA) alcalino (pH 9,00 a 25°C)..... 86
5.21 Amplificação da sequência S35/S36 de DNA de T. cruzi..... 87
5.22 Detecção molecular de Trypanosoma cruzi em placentas..... 88
5.23 Detecção molecular de Trypanosoma cruzi nos tecidos fetais..... 89

6. DISCUSSÃO..... 90

7. CONCLUSÃO..... 113

8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 115

ANEXO..... 142

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 A origem da doença de Chagas: teoria clássica e atual

O processo de ocupação das Américas representa um tema amplamente estudado por diferentes grupos que visam contribuir para o melhor entendimento deste processo. As diferentes rotas tomadas pelos grupos pré-históricos geram hipóteses divergentes a respeito do tempo em que o continente foi ocupado e sua relação com o aparecimento da doença de Chagas.

A teoria mais antiga quanto a origem da doença de Chagas em humanos remonta a história de povos andinos há cerca de 8000-6000 anos antes do presente. Esses povos domesticaram espécies de pequenos roedores para a própria alimentação que possivelmente atraíram insetos hematófagos (ROTHHAMMER et al., 1985). Além disso, a estocagem de grãos atraiu animais silvestres e, consequentemente, os vetores de *T. cruzi,* sobretudo o *Triatoma infestans,* uma vez que as habitações de barro e madeira constituíam condições ideais para a proliferação dos vetores, devido à presença de frestas características desse tipo de moradia denominadas “casas de pau a pique”. Nesta teoria, a doença de Chagas teria surgido entre os povos andinos e não teria sido um problema para regiões brasileiras, uma vez que os índios aqui presentes eram nômades e suas habitações não seriam adequadas para a disseminação dos triatomíneos (COIMBRA JR, 1988; DIAS E COURA, 1997).

Evidências obtidas em 35 múmias do deserto do Atacama, datadas de 470 a.C. e 600 a.C. revelam lesões cardíacas coerentes com o quadro clínico crônico da doença de Chagas (ROTHHAMMER, 1985). Posteriormente, pesquisadores

conseguiram detectar DNA de *T. cruzi* em múmias datadas de 4000 anos, dando início aos estudos moleculares da doença (GUHL et al., 1997; GUHL et al.,1999). Os estudos moleculares sobre amostras arqueológicas expandiram o conhecimento da origem da doença. O isolamento de DNA de *T. cruzi* em múmias Chinchorro datadas de 9000 anos – muito antes da conhecida domesticação de roedores - desmonta a teoria clássica da origem da doença (ROTHHAMMER et al., 1985; AUFDERHEIDE et al., 2004).

Os estudos de paleoepidemiologia ainda descrevem casos de megacólon chagásico datados de 1.150 antes do presente, descritos na fronteira entre Estados Unidos e México, comprovados graças a ferramentas moleculares.

1.2 Contexto histórico e a descoberta de Carlos Chagas

No século 16, muito médicos viajavam pelas Américas e alguns deles descreveram histórias de pacientes provavelmente acometidos pelo mal de Chagas. Em 1707, Miguel Diaz Pimenta, médico português, publicou o primeiro relato clínico de pacientes com sintomas que sugerem a desordem intestinal causada pela doença de Chagas. A condição denominada por ele de “bicho”, provocava retenção dos fluidos corporais e comprometia a vontade de comer (PIMENTA & MENESCAL, 1707) Um pouco mais tarde, em 1735, o médico português Luís Gomes Ferreira descreve a “injuria do bicho” como uma ampliação e distensão do reto, o que pode ter sugerido o megacólon visceral chagásico (FERREIRA, 1735; MENEGHELLII, 1996; MILES, 2004). Outros registros descrevem a condição humana conhecida como “mal do engasgo”, que possivelmente se refere à disfagia e à dificuldade de engolir (LANGGAARD, 1865).

Muitas outras referências trazem relatos históricos que indicam a presença da doença de Chagas no continente americano assolando indígenas e colonizadores europeus no século 16 (GUERRA, 1970; STEVERDIN, 2014). Apesar de todos esses achados históricos, a doença de Chagas permaneceu desconhecida até 1909.

Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas nasceu em Minas Gerais formou-se médico na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, em 1903. Obteve seu Doutorado no Instituto Manguinhos, orientado por Oswaldo Cruz, médico bacteriologista e epidemiologista. Neste período, aconteceram as grandes descobertas: Louis Pasteur e Robert Coch elaboram teorias sobre os microrganismos como causadores de doenças e a produção de soros e (STEVERDIN, 2014). Neste contexto, ampliavam-se os estudos sobre a “medicina dos climas quentes” e, em 1899, surgia na Inglaterra, escolas dedicadas ao estudo da medicina tropical (ARNOLD, 1996; WORBOYS, 1988; CARVALHEIRO et al., 2009).

Oswaldo Cruz enviou cientistas para diversas regiões do Brasil e Carlos Chagas foi designado para controlar a epidemia de malária em operários envolvidos na extensão da Estrada de Ferro Central do Brasil. Tratava-se de uma ferrovia de importância fundamental para integração e ocupação do território nacional. Carlos Chagas foi enviado a diversas expedições, contudo, foi no povoado de São Gonçalo de Tabocas, no norte de Minas Gerais, posteriormente denominado de Lassance, que ele descobriu uma nova doença humana, seu agente causal e o inseto responsável pela transmissão. Em um laboratório completamente improvisado, dentro de um vagão de trem, onde Chagas também dormia, um dos maiores cientistas brasileiros coordenava as ações para o combate da malária e observava as espécies presentes em nossa fauna. Ao examinar o sangue de um sagui, Chagas identificou um protozoário do gênero *Trypanosoma* e o denominou *Trypanosoma minasense.* Essa

nova espécie era um parasita não patogênico do macaco (Chagas, 1908). Naquele tempo, o estudo dos tripanossomas também era de interesse de pesquisadores europeus, uma vez que causavam enfermidades humanas, a exemplo da doença do sono na África (STERVENDING., 2008).

Na expedição contra a malária, Belisário Penna, um dos médicos que acompanhava Carlos Chagas, coletou amostras de insetos hematófagos em choupanas de pau-a-pique que acometiam os moradores no período noturno. Carlos Chagas examinou vários deles e encontrou no intestino desses insetos um protozoário com características que poderia ser um tripanosomatídeo de vertebrados. Neste momento, Chagas julgou a possibilidade de se tratar de um estágio evolutivo do *T. minasense* encontrado no macaco (CARVALHEIRO et al., 2009).

Devido a ausência de condições adequadas para a continuidade da pesquisa, Carlos Chagas enviou os barbeiros para Oswaldo Cruz no Instituto de Manguinhos. Os insetos foram então colocados em contato com saguis criados no laboratório, e, dentro de 20-30 dias, Oswaldo Cruz observou que os animais estavam infectados com o protozoário em questão. Após seu retorno ao Instituto, Carlos Chagas conclui que o parasita presente no sangue dos animais não era o *T. minasense*. Em uma homenagem ao seu orientador, Chagas denominou o parasita de *Trypanosoma cruzi*, sendo a nota da descoberta escrita em 17 de dezembro de 1908 e publicada em 1909 (CHAGAS, 1909a; CHAGAS, 1909c; STERVENDING, 2014).

Baseado em seus conhecimentos sobre a malária, cuja transmissão acontece também por inseto hematófago, Carlos Chagas retorna a Lassance para investigar outros hospedeiros vertebrados de *T. cruzi,* com suspeita de que o homem também fosse um deles. Assim, Chagas identificou a presença do parasita em um gato e, no dia 14 de abril de 1909, Chagas identificou a presença de *T. cruzi* no sangue de uma

criança de dois anos, em estado febril, de nome Berenice. A nota foi publicada na revista *Brasil Médico*, juntamente com outro texto lido por Oswaldo Cruz na Academia Nacional de Medicina. Outros dois artigos foram publicados na Alemanha e França. Em 1913 e 1921, Chagas recebe indicações ao Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia (CHAGAS, 1909a; CHAGAS, 1909b; CHAGAS, 1909c; CHAGAS, 1909d; CARINI, 1912; KROPF & SÁ, 2009; CARVALHEIRO et al., 2009).

De maneira única na ciência, um mesmo cientista durante um pequeno espaço de tempo descobriu um novo vetor, um novo parasito e uma nova doença humana. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas foi um dos mais célebres pesquisadores de todos os tempos tendo dedicado sua vida ao estudo da doença que leva o seu nome (CHAGAS FILHO, 1993; OZORIO DE ALMEIDA, 1938; MAGALHÃES 1944; REZENDE, 1959; COURA, 1997; MOREL, 1999; CHAGAS FILHO, 1997; CARVALHEIRO et al., 2009).

1.3 A doença de Chagas: aspectos epidemiológicos, patogenia e resposta imunológica.

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença zoonótica, transmitida pelas fezes do inseto “barbeiro” ou “*kissing bug*”, pertencente a família Reduviidae, sufamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans, Rhodnius prolixus* e *Panstrogylus megistus* os principais insetos vetores. O parasita entra no corpo humano através de microlesões quando o indivíduo coça o local com as fezes contaminadas por *T. cruzi.* Outras formas de transmissão incluem a transfusão de sangue, transplante de órgãos, o leite materno, a transmissão oral e a via congênita através da placenta (BERN et al., 2011; WHO, 2014).

Antes confinada apenas à região das Américas, hoje a doença de Chagas alcançou vários continentes devido às mudanças no padrão migratório populacional. Mais de 10 mil pessoas morrem a cada ano com manifestações clínicas da doença de Chagas. Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectas por *T. cruzi* em todo o mundo e 25 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção (WHO, 2016) .

Em 2010, a 63ª Assembleia Mundial da Saúde aprovou a resolução WHA 63.20, que destaca a severidade da doença de Chagas em países endêmicos e não endêmicos. Este documento aponta a necessidade de medidas frente à transmissão da doença, diagnóstico e tratamento.

A doença de Chagas apresenta duas fases, aguda e crônica, mas a fase aguda constitui um período crítico por diferentes razões. Durante a fase aguda, um grande número de parasitas circula no sangue, mas na maioria dos casos, os sintomas estão ausentes. Menos de 50% das pessoas infectadas apresentam sinais visíveis, como lesões na pele ou um inchaço arroxeado ao redor dos olhos, o sinal de Romana. Os primeiros sinais que indicam a interação patógeno/hospedeiro podem também ocasionar febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios linfáticos, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica (WHO, 2014; ANDRADE et al., 2014). Dos pacientes que desenvolvem a fase crônica da doença, 30% apresentam distúrbios cardíacos e 10% desenvolvem a forma digestiva, caracterizada por megaesôfago e megacólon (WHO, 2016).

A fase aguda da doença de Chagas representa o primeiro contato entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro. Os eventos imunológicos que ocorrem na fase aguda possivelmente influenciam a resposta protetora e patogênica durante o curso da doença.

A resposta imune inata é mediada principalmente por células *natural killer* (NK), neutrófilos e macrófagos. As células NK, por sua vez, representam a principal fonte de IFN-γ, citocina responsável pela ativação de macrófagos e induz a produção de óxido nítrico que combate o parasita (BASSO, 2013; ANDRADE et al., 2014; FILTJENS et al., 2016).

No estágio inicial da invasão por *T. cruzi,* a resposta imune inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro, pois atua como a primeira barreira contra o parasita. Assim, macrófagos, células NK, células dendríticas produzem citocinas (IL-12, TNF-α e IFN-γ) além de moléculas efetoras (espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e GTPases) que controlam a replicação parasitária. Ao mesmo tempo, as células do sistema imune inato, principalmente as células dendríticas, estabelecem uma ponte entre a resposta imune inata e adquirida. Para isso, a produção de IL-12 é necessária para a diferenciação e expansão clonal de células *T helper 1* (Th1), TH2, TH17, e células B. Ao mesmo tempo, o IFN-γ produzido por linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ ativam mecanismos efetores em macrófagos para a destruição de amastigotas e tripomastigotas fagocitados. Além disso, células $TCD8^+$ destroem células contendo amastigotas intracelulares, desempenhando assim sua atividade citotóxica, associada às lesões teciduais. Os anticorpos produzidos por células B opsonizam os parasitas extracelulares e facilitam sua fagocitose (TARLETON, 2007; JUNQUEIRA et al., 2010; TARLETON, 2015b).

1.4 *Doença de Chagas congênita e resposta imune materna*

Dados recentes da organização mundial de saúde apontam uma estimativa de 1.125.000 mulheres, em idade fértil, infectadas por *T. cruzi.* De acordo com essa

estimativa, a incidência de infecção congênita na América latina é de 8.668 casos por ano (WHO, 2015).

A transmissão congênita pode ocorrer nas fases aguda e crônica da infecção, e assim, perpetuar a infecção de uma geração para outra. Por esta razão, a infecção congênita constitui sério problema de saúde pública, uma vez que pode se estender por toda vida fértil da mulher e, assim, se disseminar através da migração dessas pessoas de áreas endêmicas para não endêmicas (CARLIER et al., 2011; CARLIER et al., 2015; CARLIER & TRUYENS, 2015). As rotas de transmissão parasitária associadas à intensa migração internacional das últimas décadas levaram à disseminação da doença para áreas não endêmicas como Estados Unidos, Oeste Europeu, Austrália e Japão (MONTGOMERY et al., 2014). De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), a transmissão congênita representa 25% de novos casos de doença de Chagas em todo o mundo (HOTEZ et al., 2013; MURILLO et al., 2016).

A gravidez representa um desafio imunológico único, em que feto e placenta, constituídos de antígenos diferentes da mãe, desenvolvem no útero materno. Mecanismos complexos para evitar a rejeição do feto permanecem pouco esclarecidos (PRABHUDAS et al., 2015).

Há mais de 50 anos, Medawar propôs pela primeira vez a existência de mecanismos regulatórios que suprimem o sistema imune materno em favor do desenvolvimento fetal (MEDAWAR, 1953; BILLINGTON, 2003). Trinta anos mais tarde, na década de 1980, após a descoberta da heterogeneidade nas populações de células T auxiliares (Th), durante vários anos a tolerância materna em relação aos aloantígenos foi explorada no contexto do paradigma Th1 / Th2. Acreditava-se que células do padrão Th2 juntamente com citocinas atuavam no sentido de anular a

resposta Th1 que levava ao aborto (WEGMANN et al., 1993; RAGHUPATHY, 1997). No entanto, a descoberta de mecanismos reguladores da resposta imune mostrou que a relação entre resposta inata e adaptativa é essencial para o sucesso da gravidez (SARGENT et al., 2006;TROWSDALE & BETZ, 2006; CHAOUAT, 2007; SAITO et al., 2007; SAITO et al., 2010).

As células T reguladoras são potentes supressores da resposta imunológica inflamatória e são essenciais na prevenção da imunidade destrutiva em todos os tecidos. Essas células atuam para controlar células T que reagem a "autoantígenos" e limitam a extensão e a duração das respostas a aloantígenos exógenos. Assim, as células T reguladoras são consideradas guardiãs da integridade do tecido, prevenindo dano que poderia ser causado por uma resposta imunológica exacerbada. Suas propriedades únicas conferem às células T reguladoras funções únicas nos eventos de reprodução e gravidez (GUERIN et al., 2009).

O desenvolvimento do feto frente à resposta imune materna foi amplamente definido como um estado de “tolerância” imunológica. Na literatura, o estado de tolerância frente a doenças infecciosas é a capacidade do organismo de criar condições que limitam o impacto negativo do microrganismo agressor (SCHNEIDER & AYRES, 2008). Contudo, o estado de tolerância na gravidez é definido como a capacidade do organismo materno de facilitar o desenvolvimento e diferenciação embrionária, sem que o sistema imunológico reconheça o feto como invasor. O conceito original de que os antígenos paternos expressos no embrião não eram reconhecidos foi substituído pela constatação de que a relação materno-fetal é extremamente mais complexa (SISTI et al., 2016).

Atualmente, sabe-se que em gestações bem sucedidas, o sistema imunológico materno responde efetivamente à expressão de antígenos paternos, mas

a reatividade imunológica inflamatória é regulada por linfócitos T reguladores. Essas células, identificadas como $TCD4^{+}CD25^{+}$ $Foxp3^{+}$, suprimem ativamente a resposta imune direcionada contra antígenos fetais (SAMSTEIN et al., 2012). Em modelos animais, a deleção de células T reguladoras leva à inflamação uterina, falência na implantação fetal e deficiência nas funções placentárias. Porém, a reintrodução dessas células nesses modelos deficientes restabelece o equilíbrio e conduzem a uma gestação normal (ALIJOTAS-REIG et al., 2014).

1.5 Zinco

Estudado por mais de 50 anos, o zinco é um oligoelemento de vasta atuação no organismo, com função essencial no crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (PRASAD et al., 1963; PRASAD, 1995; HAASE & RINK, 2014a). Trata-se de um elemento traço vital que se associa a estrutura quaternária de proteínas, participa de reações enzimáticas e facilita interações com outras moléculas, além de estar diretamente ligado ao sistema imunológico (HAASE & RINK, 2014a; b).

O Sistema Internacional de Nomenclaturas de Enzimas (*International Union of Biochemistry Enzimes)* classifica as enzimas em seis subclasses: oxirredutases, transferases, hidrolases, lisases, isomerases e ligases, sendo todas elas dependentes de zinco, em alguma de suas funções (KING, 2011). Inúmeras funções fisiológicas, como absorção intestinal de eletrólitos, divisão celular, regulação de neurotransmissores, atividade tímica e resposta imune são diretamente influenciadas pelo zinco (FUKADA et al., 2011). Devido à grande abrangência de atuação do zinco no funcionamento do organismo, a deficiência desse microelemento compromete a manutenção da homeostasia.

O suprimento adequado de zinco materno é essencial para a embriogênese. Durante esse processo, a expressão de genes é fundamental para o desenvolvimento fetal e o zinco tem participação na regulação da estrutura e função da cromatina (VALLEE & FALCHUK, 1993; FALCHUK, 1998). Consequentemente, quantidades insuficientes de zinco nesse período podem influenciar o fenótipo e o funcionamento de todos os órgãos (Institute of Medicine Committee on Nutritional Status During Pregnancy And Lactation, 1990). Assim, a privação materna de zinco aumenta o risco de mortalidade, retardo do crescimento e malformações, incluindo defeitos no tubo neural, demonstrados em diversos ensaios clínicos (KEEN et al., 2003; SIMMER et al., 1991).

No início da vida, a deficiência de zinco pode afetar a embriogênese e influenciar a duração da gravidez. Com algum grau de variabilidade, como outros nutrientes, o homem não possui reservas corporais de zinco disponíveis, exceto recém-nascidos que recorrem ao zinco hepático acumulado no período gestacional (ZLOTKIN & CHERIAN, 1988). Por esta razão, a preservação de um balanço positivo de zinco na mãe durante gestação é de importância crítica no início da vida, crescimento e desenvolvimento (TERRIN et al., 2015).

As baixas concentrações plasmáticas de zinco reduzem o transporte de zinco placentário e podem afetar o suprimento de zinco para o feto (KING, 2000). A deficiência de zinco também altera os níveis circulantes de vários hormônios associados ao início do parto uma vez que o zinco é essencial para o sistema imunológico (KING, 2000). Além disso, a deficiência desse elemento contribui para infecções sistêmicas e intra-uterinas, sendo essas as principais causas de parto prematuro. O baixo peso ao nascer e a prematuridade são fatores de risco significativos para a morbidade e mortalidade neonatal e infantil. Por outro lado, dados

da Organização mundial de saúde mostram que a suplementação de zinco pode melhorar os resultados da gravidez para mães e bebês (WHO, 2016).

Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que o zinco melhora a resposta imunológica de fêmeas prenhas durante a fase aguda da infecção chagásica (DA COSTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2017). Assim, buscando complementar o estudo com suplementação de zinco durante a gravidez abrangendo todas as fases da doença de Chagas, este estudo foi proposto. No presente trabalho, investigamos os diferentes fenótipos imunológicos de fêmeas prenhas no 48° dia da infecção e avaliamos as alterações que a suplementação que o zinco proporciona.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações da resposta imune durante o período gestacional no 48° dia da doença de Chagas experimental, bem como investigar a influência do zinco nos diversos fenótipos imunológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de ativação das células da resposta imune inata e adaptativa;
- Avaliar a proliferação de esplenócitos mediante estímulo específico de *Trypanosoma cruz*;
- Analisar os fenótipos apresentados por esplenócitos e células coletadas do lavado peritoneal;
- Quantificar o nitrito (metabólito estável e não volátil da produção de óxido nítrico) em culturas de células coletadas do lavado peritoneal via reação de Griess;
- Quantificar citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e quimiocina MCP-1 produzidas por linfócitos esplênicos, após estimulação *in vitro;*
- Avaliar o perfil citocinas no soro IL- 2, IL- 4, IL- 6, IL- 10, IL- 12, IL- 17, TGF- β, INF-γ e TNF-α (ELISA) e o perfil de zinco sérico;
- Analisar os diferentes estágios de apoptose celular e os níveis de corticosterona;
- Avaliar os parâmetros morfológicos; peso e comprimento fetal, peso e diâmetro placentário
- Quantificar parasitas sanguíneos;

- Detectar DNA genômico de *T. cruzi* no tecido fetal, placentário e cardíaco dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

O zinco é um microelemento essencial à manutenção da vida e está relacionado à composição estrutural de mais de 300 enzimas, proteínas, fatores de crescimento, citocinas, receptores, fatores de transcrição, além do papel essencial de sinalização diversas rotas metabólicas (VALLEE et al., 1993; PRASAD et al., 1995; COUSINS et al., 2010).

Durante a prenhez, a demanda de zinco no organismo é aumentada, razão pela qual as mulheres grávidas são mais suscetíveis a apresentarem déficit deste micronutriente (CAULFIELD et al., 1998; BRIEFEL et al., 2000; PETRY et al., 2016).

Estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o zinco e L-arginina exercem um importante papel regulatório na imunidade a frente *T. cruzi* (DA COSTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; DA COSTA et al., 2017).

A procura de terapias alternativas para o controle da doença de Chagas é um dos grandes desafios para o nosso grupo de pesquisa e o papel imunoprotetor de oligoelementos, como o zinco, fundamentam o delineamento deste trabalho.

Assim, este estudo busca averiguar a ativação de diferentes compartimentos do sistema imune frente ao parasita, ampliando o estudo fenotípico, bem como o entendimento das subpopulações de linfócitos T. Desta maneira, este trabalho visa compreender os aspectos imunomoduladores durante o período gestacional e suas possíveis alterações no 48° dia da infecção (18° dia da prenhez) na doença de Chagas experimental, mediante a suplementação com zinco.

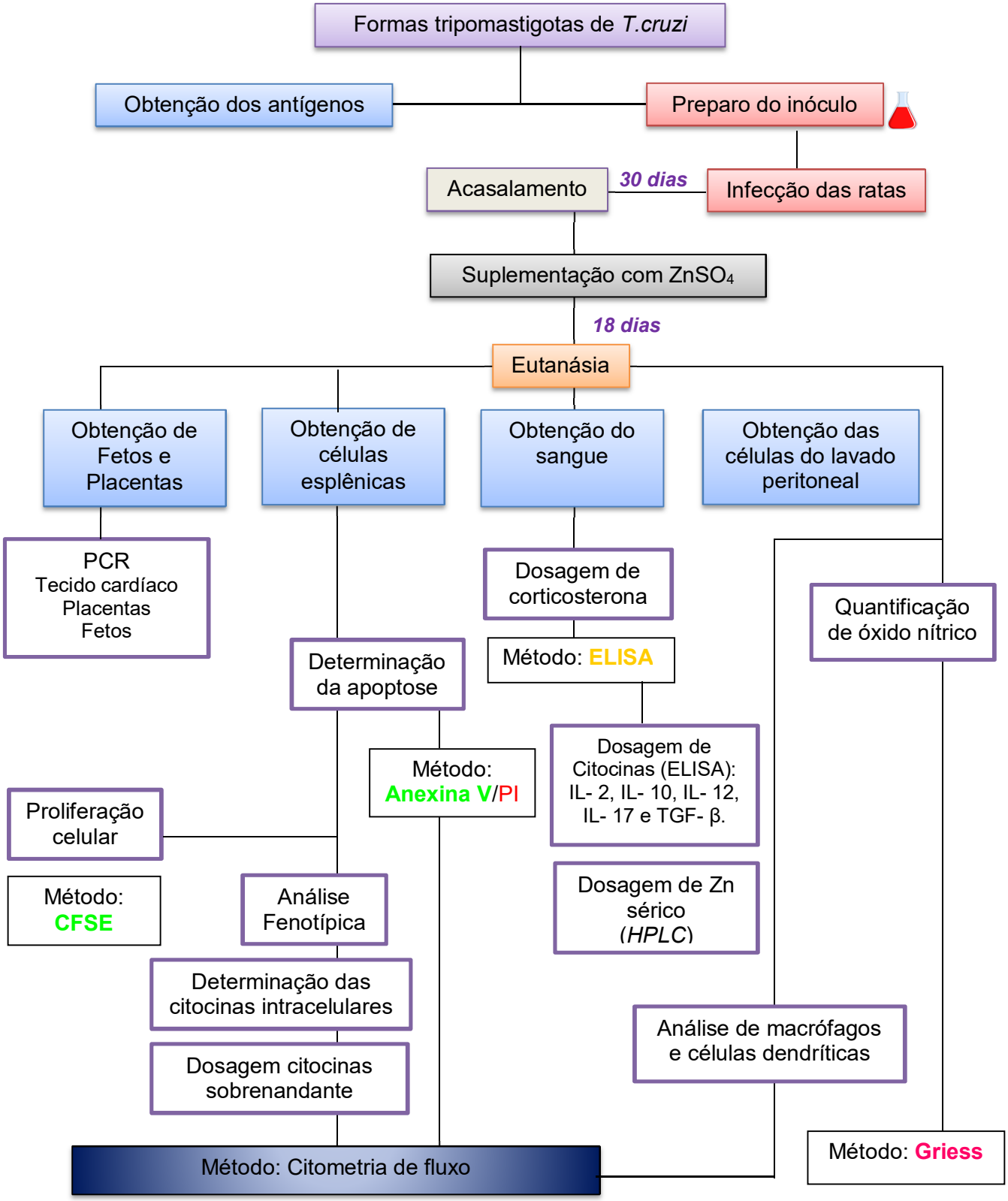
Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram ação imunomoduladora do zinco durante a prenhez de ratas Wistar na fase aguda da doença de Chagas (DA

COSTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2017). Com base nesses resultados e mediante a importância desse elemento no período gestacional, esse trabalho visa investigar o papel da suplementação com zinco, em fêmeas prenhas, no 48° dia da doença de Chagas experimental.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma de execução dos experimentos



4.1 Animais

Foram utilizadas 20 ratas Wistar com 04 semanas de idade (100 gramas), provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto.

As ratas foram devidamente ambientadas no biotério do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP), mantidas em caixas plásticas, sendo 2 animais por caixa à temperatura de 23 ± 2°C, com ciclo claro/escuro 12/12 horas.

Os animais foram alimentados com ração específica para roedores e água *ad libitum.* A troca de maravalha e a limpeza das caixas foram realizadas a cada três dias para evitar o acúmulo de amônia, conforme os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O Protocolo experimental deste trabalho foi aprovado em reunião da CEUA de 01/02/2012 (Protocolo n° 11.1.1210..53.2).

4.2 Grupos Experimentais

Tabela 1. Descrição dos grupos e número de animais utilizados

Grupos (Fêmeas Prenhas)	*Sem tratamento*	*Tratamento com $ZnSO_4$*
PRENHAS CONTROLE (PC)	n=5	n=5
PRENHAS INFECTADAS (PI)	n=5	n=5

Grupos Controles:

Prenhas controle sem tratamento (PC)

Prenhas controle tratadas com sulfato de zinco (PCZ)

Grupos infectados (Cepa Y de *Trypanosoma cruzi*):

Prenhas infectadas sem tratamento (PI)

Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ)

4.3 Infecção

Os animais dos grupos infectados foram inoculados intraperitonealmente (i.p) com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*.

SILVA & NUSSENZVEIG (1953), isolaram a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em paciente na fase aguda da infecção por meio do xenodiagnóstico. Sabe-se que a cepa Y é altamente virulenta e está associada à miocardite chagásica e redução de neurônios cardíacos durante a fase crônica da infecção. Além disso, estudos mostraram que a cepa Y quando inoculada em ratos Wistar apresenta pico parasitêmico entre o 7° e 14° dias da infecção (DA COSTA et al., 2013). Após este período, há uma redução da parasitemia. A cepa Y é mantida em laboratório nos camundongos *Swiss* não isogênicos e os repiques com o sangue infectado são realizados semanalmente.

4.4 Acasalamento

Após 30 dias de infecção, as ratas foram colocadas para acasalamento com os machos durante três dias.

Em cada caixa, utilizou-se proporção de duas fêmeas para cada macho e a presença do tampão vaginal observado determinou o primeiro dia da gestação (DA COSTA et al., 2013).

Após o acasalamento, as fêmeas foram mantidas em caixas individuais.

4.5 Suplementação com Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$)

Os grupos foram tratados via oral, com 20mg de sulfato de zinco/ Kg de peso/dia (Sigma Chemical Co. MO, USA) (DA COSTA et al., 2013) diluídos em água destilada, a partir do 1° dia da prenhez até o 18º dia da prenhez.

A suplementação foi realizada uma vez ao dia, pela parte da manhã, obedecendo ao mesmo horário de tratamento todos os dias.

4.6 Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados no 48° dia de infecção, correspondendo ao 18º dia da prenhez.

Assim, foram estudados os efeitos da suplementação com sulfato de zinco na no 48° dia da infecção chagásica e no final da prenhez de ratas Wistar (18º dia da prenhez).

4.7 Eutanásia e coleta de sangue

Os animais foram anestesiados previamente com Tribromoetanol 2,5% via intraperitoneal (250mg/kg) e posteriormente decaptados.

Após a morte dos animais, foi coletado 5 μL de sangue para determinação da parasitemia.

A obtenção do plasma para posterior dosagem de corticosterona, foi realizada colhendo-se 3 mL de sangue em tubos *vacutainer* contendo EDTA K_2 (BD Biosciences Pharmigen).

Também foram colhidos 6 mL de sangue em tubos *vacutainer* sem coagulante para obtenção do soro e posterior dosagem das interleucinas.

4.8 Parasitemia

A contagem de parasitas foi realizada conforme método de BRENER (1962).

O método determina que se aplique uma alíquota de 5 μL sobre a lâmina de microscopia e cubra com lamínula 22 x 22 mm. O número de parasitas é determinado lendo-se 50 campos microscópicos. Após esta contagem, o número obtido é multiplicado por um fator que é determinado de acordo com o número total de campos da lamínula 22 x 22 mm no microscópio utilizado com aumento de 400 vezes (objetiva de 40X e ocular de 10X) dividido por 50 (BRENER, 1962).

4.9 Obtenção de antígenos de T. cruzi

Os antígenos dos parasitas utilizados nos ensaios de proliferação celular e apoptose *in vitro* foram preparados a partir de formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi.*

Os tripomastigotas foram obtidos de células LLCMK2 *(monkey kidney fibroblast cell line)* mantidas em garrafas de 25 cm^2 e 75 cm^2 a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2. As células foram cultivadas em meio RPMI (Sigma – Aldrich – Ltda) contendo 5% de soro fetal bovino (Gibco).

Após a obtenção da cultura confluente e uniforme, as formas tripomastigotas foram transferidas para tubos Falcon 50 mL e centrifugadas a 40g, 4°C por 10 minutos para separação de células debris que ficam no pellet. Posteriormente, recolheu-se o sobrenadante e outra centrifugação a 700g a 4°C por 10 minutos foi realizada.

O pellet resultante dessa última centrifugação com as formas tripomastigotas foi lavado 5 vezes em PBS (1X) gelado pH 7,2 a 3000rpm a 4°C por 5 minutos. Após a última centrifugação, o sobrenadante dessa suspensão foi descartado e os parasitas foram ressuspensos em 2 mL de PBS (1X) gelado e submetido a três ciclos de congelamento a -80°C e aquecimento 37°C. Terminando-se os ciclos, a suspensão foi submetida a 3 ciclos de sonicação (20KHz, 30watts) por 15 segundos cada uma mantendo-se os tubos em gelo. Finalmente, a suspensão obtida após a sonicação foi centrifugada a 20000g por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45µm. A extração resultante de diversos processos foi quantificada através do método de Bradford (1976) com curva padrão de albumina.

4.10 Quantificação de óxido nítrico a partir de células do lavado peritoneal (método de Griess)

Em decorrência da volatilidade do óxido nítrico (NO) a dosagem deste componente no sobrenadante da cultura de célula é realizada por meio detecção de nitrito (NO^{-}_{2}) via reação de Griess.

O método consiste na reação do nitrito com a sulfanilamida em meio ácido que forma um sal diazônio. Posteriormente, esse sal reage com a N-alpha-naphthyl-ethylenediamine (NEED) e forma um azo composto de cor rosa que pode ser mensurado a 540nm.

A cavidade peritoneal das ratas foi lavada com 10 mL de RPMI incompleto a 4ºC, seguido de centrifugação (10 minutos à 1800 rpm). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2mL de RPMI com estreptomicina e penicilina (100µg/mL) suplementado com 10% de soro bovino fetal. Desta suspensão, uma alíquota de 5 µL foi diluída em azul de Trypan (495 µL) para contagem das células viáveis. Após a contagem em câmara de Neubauer, as concentrações foram ajustadas para 2 x 10^7 cel/mL; 100µL desta suspensão foi distribuída em placa de 96 poços, contendo 2 x 10^6 cel/poço.

Todas as amostras foram feitas em triplicata sendo três delas sem estímulo e três estimuladas com 100µL / poço de LPS (10 µg/mL) (*E. coli*, sorotipo 026:B6, Sigma, USA). A placa foi levada na estufa de atmosfera úmida e 5% de CO_2, durante 48 horas a 37ºC. Após este período, recolhemos 100 µL do sobrenadante e transferimos para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionamos 100 µL de sulfanilamida por 10 minutos ao abrigo de luz e em seguida 100 µL de NEED. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA) com filtro de 540nm e comparada com a curva padrão de 100µM a 6µM em diluição seriada na base 2 (TERENZI et al., 1995; HRUBY & BECK,1997; BRYAN & GRISHAM, 2007).

4.11 Preparo da suspensão de células do baço

O baço dos animais foi recolhido cirurgicamente e colocado em placa de petri com 5mL de RPMI-1640 gelado para a posterior maceração. Os baços foram macerados com auxílio de êmbolo estéril e *cell strainer* (BD Falcon) de diâmetro 70µm. Após a maceração, o conteúdo celular foi transferido para tubos seguido de

centrifugação a 1800rpm, 5 minutos, 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspenso em 2mL de tampão de lise ACK (NH_4Cl 0,15M, $KHCO_3$ 1mM, Na_2EDTA 0,1mM) por 2 minutos. Ao término da hemólise, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em 10mL de RPMI – 1640 em banho de gelo por 10 minutos para a sedimentação e remoção de fragmentos tissulares e matriz extra celular.

Para a contagem do número de células, 5µL da suspensão celular homogeneizada foi adicionada a 495µL de azul de Trypan (0,4%) para a contagem em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi ajustada para 2 x10^6 célula por tubo.

4.12 Avaliação da proliferação celular (ensaio de CFSE basal e após cultura de 5 dias)

O ensaio de proliferação de esplenócitos foi realizado com alíquotas de 100µL de amostra (2 x10^6 cel/poço) distribuídas em tubos apropriados e diluídas em PBS e CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester* – Molecular Probes Invitrogen) a 5µM aquecido a 37°C. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos ao abrigo de luz. Após esse período, adicionamos 100µL de RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino gelado. As amostras foram então centrifugadas a 1800rpm por 6 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em RPMI suplementado a 5% de SBF. Amostras foram transferidas para tubos de citometria para a leitura basal e outra parte distribuída em placa de 96 poços de fundo em U. Os poços estimulados foram adicionados de 100µL de extrato parasitário e incubados por 72horas em estufa de atmosfera úmida e 5% de CO_2 a 37°C.

Após o quarto dia de incubação, as placas foram então submetidas a centrifugação de 1800rpm por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em tubos *eppendorf* de 2mL para posterior dosagem de citocinas por método CBA (*Cytokine Bead Array*) . O *pellet* aderido ao fundo da placa foi lavado por 2 vezes com 200µL de PBS (1x) e transferido para tubos de citometria. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3800rpm por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. A cada tubo foi adicionado 100µL de *Fcblock* e as amostras incubadas por 20 minutos em geladeira. Ao término da incubação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (1x) e novamente centrifugadas a 3800rpm por 4 minutos a 4°C. Para a marcação de linfócitos CD3, as amostras foram incubadas em seguida com anticorpo monoclonal anti-CD3 APC (BD Bioscience Pharmigen) em diluição 1:100 por 30 minutos em geladeira. Após a incubação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (1x) e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em *Cell Staining Buffer* (BD) seguindo-se a leitura em citômetro de fluxo FACScanto e analisadas em software FACSDiva (BD Bioscience).

A Figura 1 mostra a estratégia de seleção da população linfocitária representativo da proliferação de linfócitos marcados com CFSE.

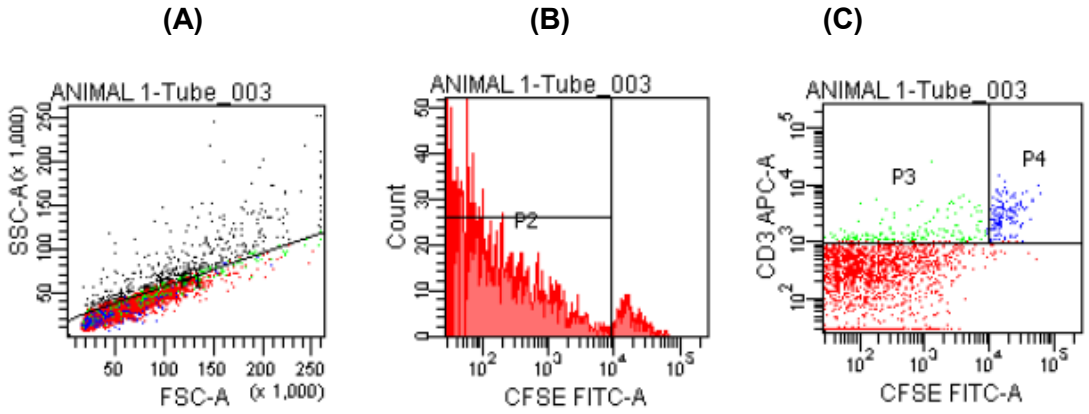


Figura 1. **A -** Estratégia de seleção da população linfocitária de acordo com tamanho e complexidade. **B -** Histograma representativo da proliferação de linfócitos marcados com CFSE. **C -** Gráfico em *dot plot* representativo de células $CD3^{+}CFSE^{+}$.

4.13 Análise do processo de apoptose em linfócitos esplênicos

Para a detecção do processo de apoptose e viabilidade celular, utilizamos a marcação com Anexina V FITC e Iodeto de propídeo.

A molécula de Anexina se liga à fosfatidilserina (PS) quando esta se desloca da bicamada lipídica para a superfície celular, sinalizando assim, início do processo apoptótico.

O iodeto de propídeo (PI) é um marcador nuclear fluorescente de alto peso molecular que, por sua vez, não é capaz de penetrar no interior celular sem que o processo de apoptose alcance o estágio mais avançado. Por esta razão, a marcação com iodeto e anexina V concomitantemente permite a diferenciação entre células íntegras (Anexina V^{-} PI^{-}), células em estágio inicial de apoptose (Anexina V^{+} PI^{-}) e células em estágio tardio de apoptose (Anexina V^{+} PI^{+}).

As células foram distribuídas em tubos de citometria (200µL de amostra/ $4x10^{6}$ cel/ tubo) e centrifugadas a 3800rpm por 4 minutos a 4°C. Após a centrifugação as

células foram incubadas com tampão de ligação *Bindding Buffer* diluído (BD Bioscience Pharmigen) e Anexina V em diluição 1:100. As amostras então foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, adicionamos o iodeto de propídeo (diluição 1:100µL) e as células foram lidas em citômetro de fluxo FACScanto e analisadas em software FACSDiva (BD).

De forma similar, o ensaio para a avaliação do processo de apoptose em cultura de células esplênicas foi realizado em placas de 96 poços. As amostras foram distribuídas ($2x10^6$ cel/poço) e incubadas em estufa de atmosfera úmida a 5%CO_2 por um período de 24 horas. Adicionalmente, amostras também foram distribuídas e incubadas com antígeno específico de *T.cruzi (*100µg/mL). Após o período de incubação, as células foram transferidas para tubos de citometria e lavadas duas vezes em tampão com 200µL de *Annexin Bindding Buffer* (BD) e centrifugadas a 3800rpm a 4°C por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet foi* ressuspenso com tampão de ligação *Annexin Bindding Buffer* diluído e Anexina V em diluição 1:100. Prosseguiu-se a incubação de 15 minutos no escuro em temperatura ambiente. No momento da leitura, adicionamos o PI em diluição 1:100 e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo FACScanto e analisadas em software FACSDiva (BD), conforme apresentado na Figura 2.

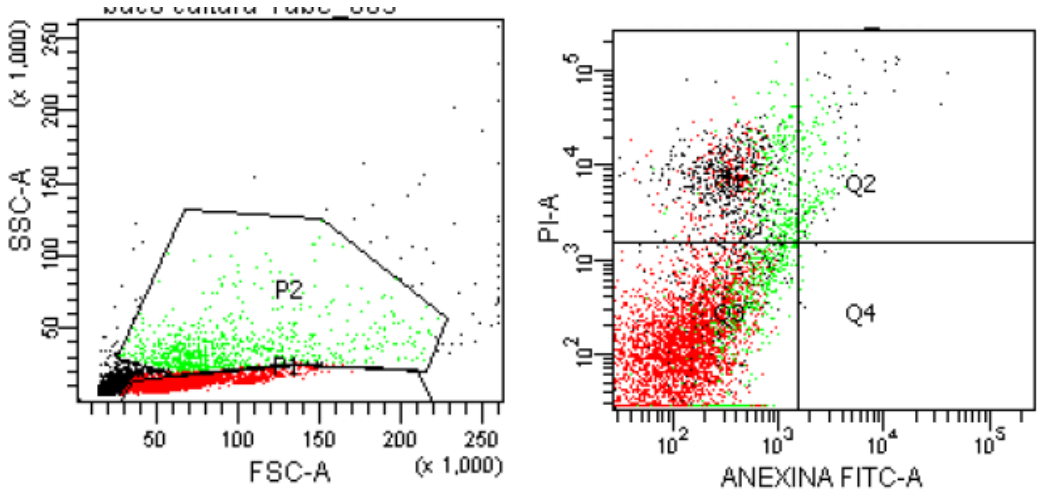


Figura 2. Avaliação da morte celular por meio da análise da externalilação de resíduos de fosfatidilserina. A figura mostra porcentagem de células viáveis (quadrante inferior esquerdo: Anexina V^- PI^-), células em fase precoce de apoptose (quadrante inferior direito: Anexina V^+ PI^-) e células em fase tardia de apoptose ou em necrose (quadrante superior direito: Anexina V^+ PI^+). Gráfico em *dot plot* ilustrativo dos diferentes estágios de apoptose.

4.14 Caracterização fenotípica de células do lavado peritoneal por citometria de fluxo

Após a eutanásia, os animais foram colocados em câmara de fluxo asséptica em decúbito dorsal sobre um suporte de aço cirúrgico para a dissecção e colhimento dos órgãos. A cavidade abdominal foi lavada com injeção de 10mL de RPMI - 1640 estéril (pH 7,2) gelado para a obtenção do lavado peritoneal. A suspensão de células foi centrifugada a 1800rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2mL de RPMI -1640. Para a contagem de células em câmara de Neubauer, uma alíquota de 5 µL foi diluída em 495 µL azul de Trypan 0,4%.

As células foram contadas ajustadas para 2 x 10^6 célula por tubo. As suspensões foram distribuídas em tubo de citometria e fixadas por 10 minutos no gelo com paraformaldeído a 3,72%. Após a fixação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (*Phosphate Buffer Saline* 1x) gelado e centrifugadas a 3800rpm por 4 minutos,

6°C. Em seguida, as suspensões celulares foram incubadas com *Fcblock* (CD32 1:100 µL, BD Biosciences Pharmigen) por 20 minutos em geladeira seguido de outra lavagem com 500 µL PBS. Após a centrifugação, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-RT1B, anti-macrophage, anti-CD86, anti-CD80 e anti-CD11bc (BD Bioscience Pharmigen) (Tabela 2) diluição de 1:100 µL por 30 minutos em geladeira. Ao fim da incubação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS, centrifugadas a 3800rpm por 4 minutos, 6°C. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 150 µL de *Cell Staining Buffer* (BD Bioscience Pharmigen) e as amostras foram lidas em Citômetro de fluxo BD FACS-canto e analisadas em software FACS Diva (BD).

A Figura 3 mostra a estratégia de aquisição de células apresentadoras de antígenos de acordo com tamanho e complexidade.

Tabela 2. Anticorpos monoclonais para análise fenotípica de células do lavado peritoneal

ANTICORPO	CLONE	CONCENTRAÇÃO
Anti-macrophage- subset – PE	HIS36	0,2mg/mL
Anti - RT1B – PercP	OX-6	0,2mg/mL
Anti - CD86 – FITC	24F	0,5mg/mL
Anti - CD80 – PE	3H5	0,2mg/mL
Anti – CD11bc – PECy7	OX-32	0,2mg/mL

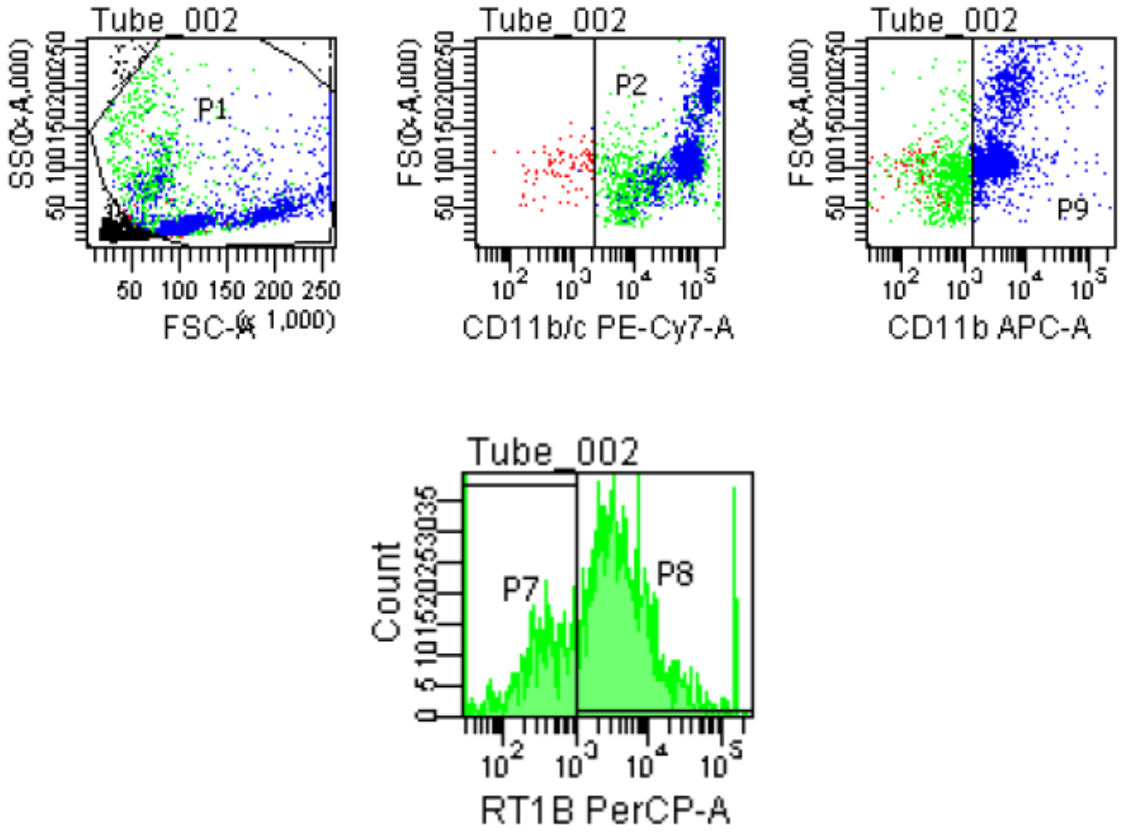


Figura 3. Estratégia de aquisição de células apresentadoras de antígenos de acordo com tamanho e complexidade. Gráfico em *dot plot* ilustrativo representa expressão de células CD11b/c e CD11b. O histograma representa expressão de RT1B por células peritoneais.

4.15 Análise fenotípica de células do baço por citometria de fluxo

Distribuímos 100µL (2 x 10^6 célula por tubo) da suspensão celular em tubos de citometria seguido de incubação com *Fcblock* por 20 minutos em geladeira. Após a incubação, as amostras foram lavadas com 500 µL de PBS (1X) e centrifugadas a 3800rpm, 4 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso e as amostras foram incubadas com anticorpos monoclonais (Tabela 3) por 30 minutos, ao abrigo de luz em geladeira. As diluições (1:100 µL) foram feitas em tampão *Cell Staining Buffer* (BD Bioscience Pharmigen). Novamente as células foram lavadas em PBS (1x) e ressuspensas em

150 µL em *Cell Staining Buffer*. As amostras foram lidas emcitômetro de fluxo BD FACScanto com software FACSDiva.

A Tabela 4 apresenta os marcadores celulares utilizados na caracterização fenotípica.

As Figuras 4 e 5 mostram as estratégias de aquisição da população de linfócitos conforme tamanho e complexidade.

Tabela 3. Anticorpos monoclonais para análise fenotípica

Anticorpo	***Clone***	***Concentração***
Anti-CD3- APC	1F4	0,2mg/mL
Anti – CD3- FITC	1F4	0,5mg/mL
Anti – CD4- PE/PECy7	OX-38/OX-35	0,2mg/mL
Anti – CD161- FITC	10/78	0,5mg/mL
Anti – CD8- PercP	OX-38	0,2mg/mL
Anti – CD11bc- PECy7	OX-42	0,2mg/mL
Anti – CD11a- FITC	WT.1	0,5mg/mL
Anti – CD28- FITC	JJ319	0,2mg/mL
Anti – CD45- PE	OX-33	0,2mg/mL
Anti – CD80- PE	3H5	0,2mg/mL
Anti – CD86- FITC	24F	0,2mg/mL
Anti –RT1B- PercP	OX-6	0,2mg/mL
Anti – Macrophage subset	H1S36	0,2mg/mL

Tabela 4. Descrição dos marcadores celulares

Descrição	Marcadores Celulares
Marcador de superfície celular da população de linfócitos T	CD3
Marcadores de superfície celular de subpopulações de linfócitos T	CD4 e CD8
Marcadores de superfície celular para moléculas coestimulatórias em APCs	CD80 e CD86
Marcador de superfície celular para molécula coestimulatória em células T	CD28
Marcadores de superfície celular da população de células NK	CD161
Molécula de adesão ao endotélio, família das integrinas	CD11a (LFA-1)
Marcador de superfície celular de macrófagos	Macrophage subset
Marcador de superfície celular da população de linfócitos B	CD45RA
Marcador de ativação celular	RT1B (MHC II)
Marcador de superfície celular de APCs	CD11bc
Marcadores de ativação de linfócitos	CD62L e CD44

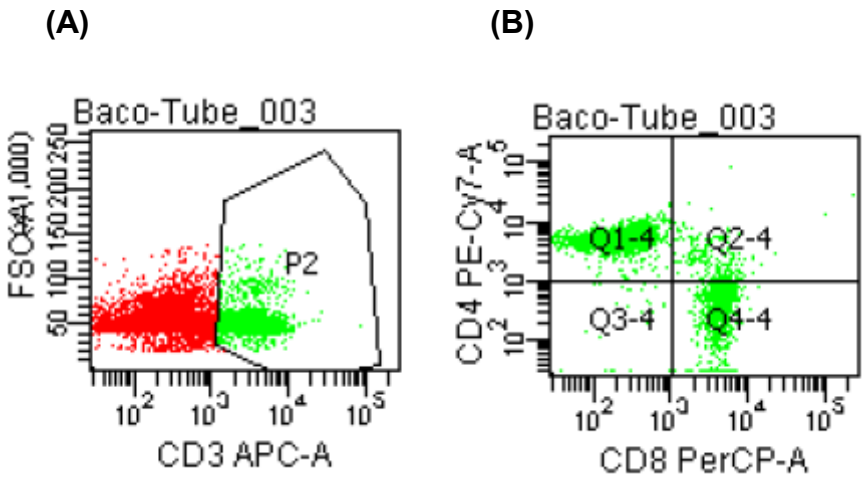


Figura 4. A - Estratégia de aquisição da população de linfócitos conforme tamanho, complexidade e expressão de $CD3^+$. **B -** Gráfico em *dot plot* representativo das subpopulações de $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$.

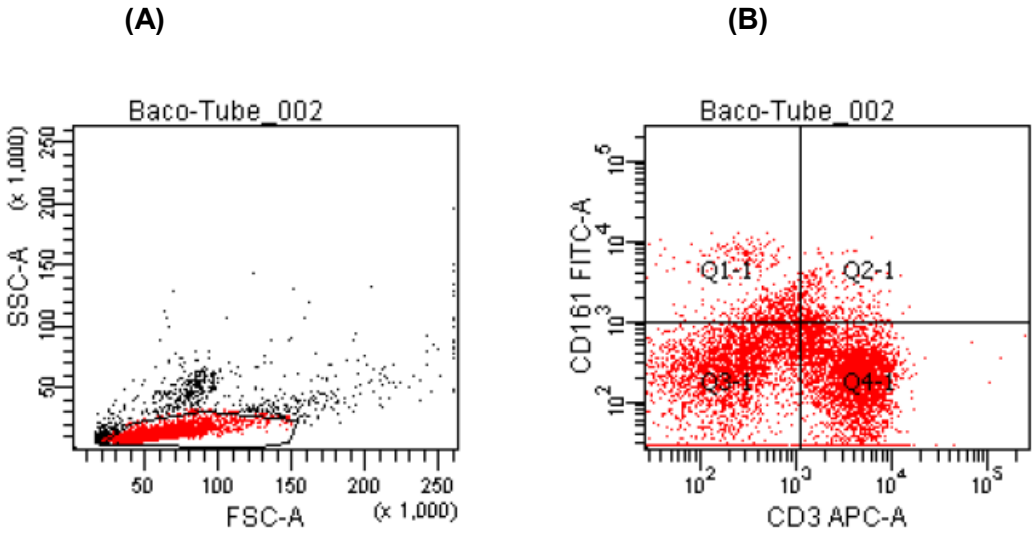


Figura 5. A - Estratégia de aquisição da população linfocitária conforme tamanho e complexidade. **B -** Gráfico representativo das populações de células $CD161^+$ (linfócitos NK) e $CD3^+CD161^+$ (linfócitos NKT).

4.16 Quantificação das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α, e quimiocina MCP-1

As amostras (100µL da suspensão de células do baço) foram distribuídas em placas de 96 poços sendo $2x10^6$ celulas/poço, todas em duplicata. Parte desses poços recebeu estímulo de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 5µg/mL e ionomicina 1µg/mL (Sigma / Aldrich).

Após a adição do estímulo para secreção de citocinas, as placas foram incubadas por 4 horas em estufa de atmosfera úmida e 5% de CO_2. Ao término das 4 horas, as placas foram retiradas da estufa e então adicionamos 10µg/mL de Brefeldina A (BD Bioscience Pharmigen) em todos os poços. As placas foram novamente incubadas por mais 2 horas em estufa de atmosfera úmida e 5% de CO_2. Ao final dessa última incubação, as placas foram centrifugadas a 1800 rpm por 6 minutos a

4°C e o sobrenadante foi descartado. Todos os poços foram lavados duas vezes com 200µL de *Cell Stain Buffer BSA* (BD Bioscience Pharmigen) e o conteúdo dos poços foi transferido para tubos de citometria. Os tubos foram então centrifugados a 1800rpm por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em tampão *Cell Stain Buffer BSA* e todas as amostras foram incubadas com 100 µL de *Fcblock* por 20 minutos a 4°C em geladeira.

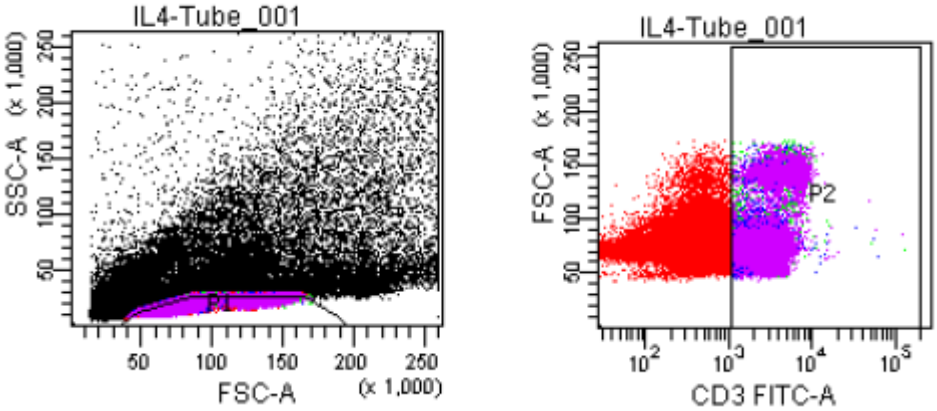
Após a incubação, as células foram lavadas com 500 µL de *Cell Stain Buffer BSA*, centrifugadas por 4 minutos a 1800 rpm 4°C e o sobrenadante descartado. Para a marcação de superfície, as células foram incubadas com 100 µL da solução de anticorpos monoclonais anti- CD3, anti- CD4 e anti- CD8 (BD) em diluição 1:100, por 30 minutos ao abrigo de luz em geladeira. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas com 500 µL de *Cell Stain Buffer BSA* e ressuspensas e incubadas por 20 minutos (geladeira) em 250 µL de tampão *CitoFix/CitoPerm* (BD Bioscience) para permeabilização da membrana. Em seguida, as células foram lavadas em tampão *PermWash* (BD) e incubadas por 30 minutos a 4°C em geladeira com anticorpos monoclonais anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IFN-γ, anti-TNF-α, e anti-MCP-1 diluídos em *PermWash*.

Ao final desse período, as amostras foram lavadas em 200 µL de tampão *PermWash,* centrifugadas a 1800rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 150 µL de paraformaldeído e prosseguiu-se a leitura em citômetro de fluxo FACSCanto com análise em software FACSDiva (BD Bioscience).

A Figura 6 mostra a estratégia de aquisição da população de linfócitos de acordo com tamanho, complexidade e expressão de CD3.

Os histogramas representativos das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ produtores de IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e quimiocina MCP-1 estão contidos na Figura 7.

(A)



(B)

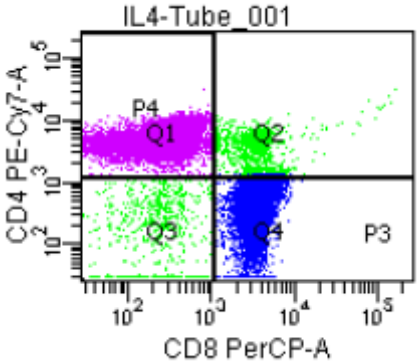


Figura 6. A - Estratégia de aquisição da população de linfócitos de acordo com tamanho, complexidade e expressão de CD3. **B -** Gráfico em *dot plot* ilustrativo das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$.

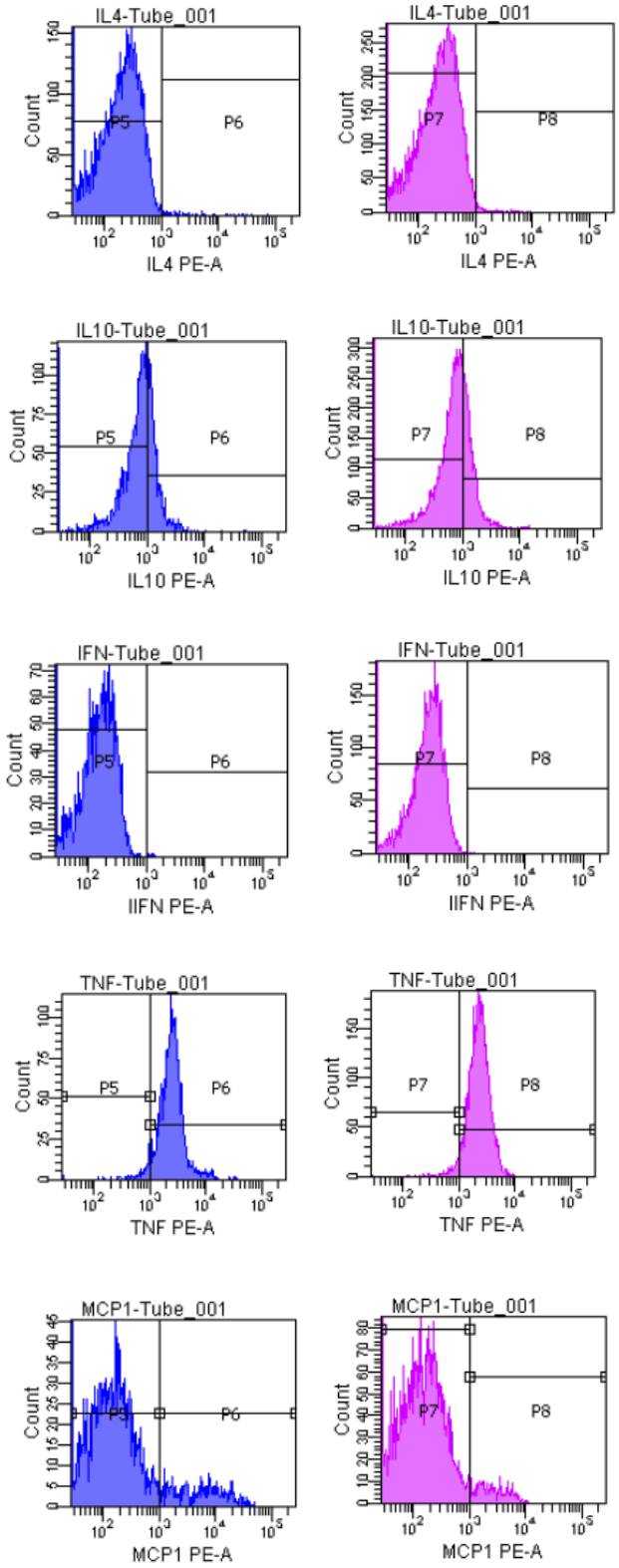


Figura 7. Histogramas representativos das subpopulações de linfócitos $CD3^{+}CD4^{+}$ e $CD3^{+}CD8^{+}$ produtores de IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e quimiocina MCP-1.

4.17 Ensaios imunológicos – Dosagens de Citocinas

Dosagens de TGF-β, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17 foram mensuradas nas amostras de soro dos animais com Kits de ELISA (R&D Systems, INC, USA; Biolegend Inc.San Diego, CA). Os testes foram realizados em duplicata de acordo com as instruções do fabricante de cada Kit utilizado. As leituras foram feitas em leitor de ELISA (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA).

4.18 Caracterização fenotípica de células T reguladoras ($CD4^+$ $CD25^+$) conforme da expressão do fator de transcrição *forkhead box* P3 (FoxP3)

Alíquotas de 100µL da suspensão de células do baço foram distribuídas em tubos de citometria ($2x10^6$ células/tubo) e fixadas com 150 µL de paraformaldeído 3,72% por 10 minutos em banho de gelo. Em seguida, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (1x) e centrifugadas a 1800rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspenso em 50 µL de solução *Fcblock* (BD Bioscience) e incubadas em geladeira por 20 minutos.

Imediatamente após a incubação, as amostras foram novamente lavadas com 500 µL de PBS (1x), centrifugadas a 1800rpm a 4°C por 4 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para a marcação de superfície, as células foram então incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD3 (FITC), anti-CD4 (PECy7) e anti-CD25 (PE) (BD Bioscience) por 30 minutos ao abrigo de luz em geladeira.

Ao final da incubação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (1x) e novamente centrifugadas a 1800rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi vertido

e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão *Fixperm* diluído (Biolegend) por 20 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz.

Em seguida, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (1x) e centrifugadas a 1800rpm, 4°C por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspenso em 200 µL de tampão *Permbuffer* (Biolegend) por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1800rpm, 4°C por 4 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Finalmente, as células foram então incubadas com anticorpo monoclonal anti-Foxp3 (Biolegend) por 30 minutos ao abrigo de luz em geladeira. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas com 500 µL de PBS (1x), centrifugadas e ressuspensas em 150 µL de *Cell Staining Buffer* (BD Bioscience). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto e analisadas em software FACSDiva (BD).

A Figura 8 apresenta a estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com características de tamanho, complexidade e expressão de $CD3^{+}$ $CD4^{+}$ $CD25^{+}$ $FoxP3^{high}$.

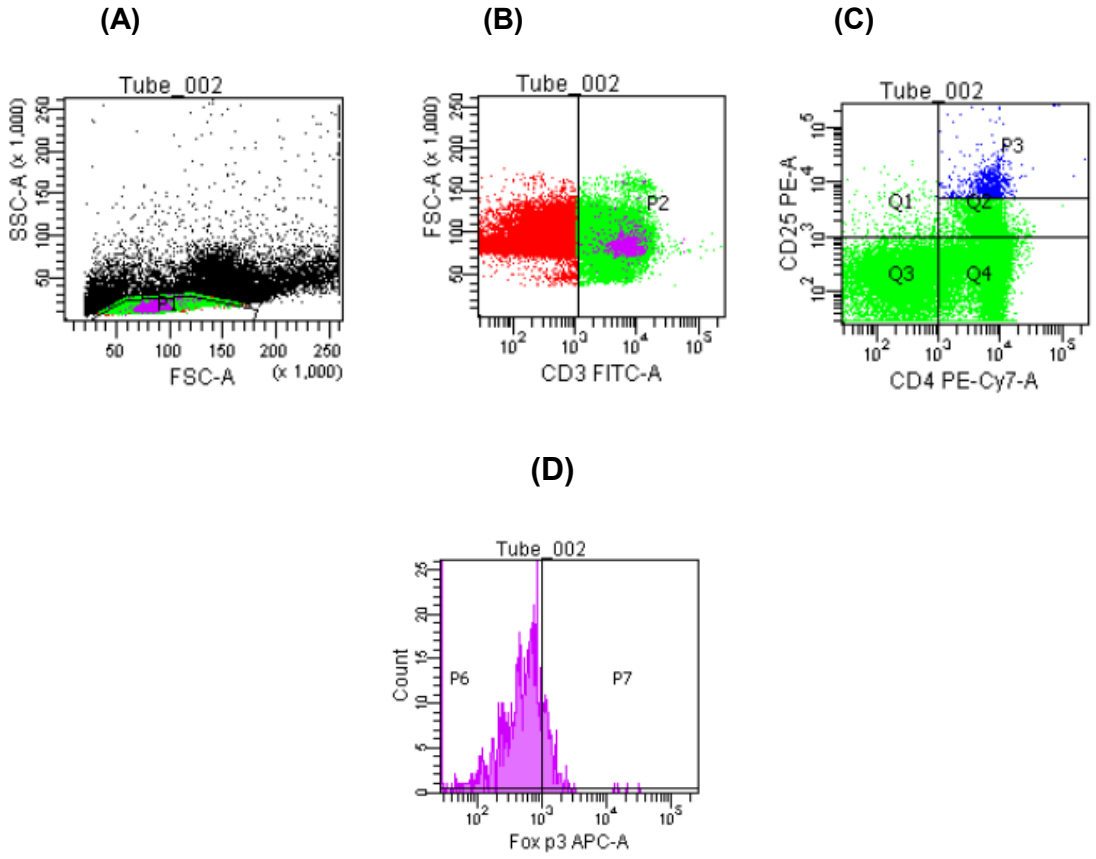


Figura 8. A - Estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com características de tamanho e complexidade. **B -** Gráfico em *dot plot* representativo de linfócitos de acordo com a expressão de $CD3^+$. **C -** Gráfico em *dot plot* ilustrativo da subpopulação de linfócitos de acordo com a expressão $CD4^+$ $CD25^+$. **D -** histograma ilustrativo de acordo com a expressão de FOXP3.

4.19 Dosagem de corticosterona

As dosagens de corticosterona foram realizadas em amostras de plasma das ratas Wistar prenhas nos diferentes grupos experimentais. Para isso, utilizamos Kit imunoenzimático (ABCAM – England) conforme orientações do fabricante.

Os testes foram feitos em duplicata no mesmo ensaio e as leituras realizadas em leitor de ELISA (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA) com comprimento

de onda de 450nm. Os cálculos foram obtidos em pg/mL através do mesmo programa e comparados à curva padrão do kit.

4.20 Análise dos parâmetros morfológicos (peso e comprimento fetal; peso e diâmetro placentário).

Os fetos e placentas foram pesados em balança analítica (Mettler H10W). O diâmetro placentário e o comprimento fetal foram medidos em paquímetro digital (Mitutoyo, Kawasaki, Japan).

4.21 Determinação de zinco sérico em amostras do plasma por HPLC (High Performance Liquid Cromatograph)

Para a dosagem de zinco em amostras de plasma, foi utilizado método proposto por Batista et al. (2009) com algumas modificações. As amostras foram diluídas 1:20 em tubo Falcon de 15mL (Becton Dickinson) em solução contendo 0,01%(v/v) de Triton X-100, 0,5%(V/V) de ácido nítrico e 10 µg de L-1 Rh (padrão interno),

As análises foram realizadas em espectômetro de massa com célula de reação (ICP-MS ELAN DRCII, PerkinElmer, SCIEX, Norwalk, CT, USA) com argon de alta pureza (99.999%, Praxaair, Brazil).

O sistema de introdução da amostra foi composto por câmara de nebulização ciclônica (Meinhard), com bico injetor de quartzo conectado por tubos Tygon à bomba peristáltica (20 rpm) do ICP-MS. O ICP-MS foi operado com Pt sampler e skimmer cones (Perkin Elmer).

4.22 Detecção de T. cruzi por PCR

4.22.1 Extração de DNA de T. cruzi em tecido fixado

Na primeira análise, o material genético foi extraído diretamente do tecido placentário (10-50 mg) fixado em formol a 3,72% (v/v) e conservado em álcool 80%. As amostras foram lavadas com PBS 1x e incubadas com 500µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl [pH 7.6], 10 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 0.5% SDS, 300 µg / proteinase K por mL) por 18 hs, 50°C. O DNA foi então extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega - USA), conforme manual. O material genético foi visualizado sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL). Nesta extração, entretanto, a amostra foi muito fragmentada, visualizada como um rastro tênue de DNA.

No intuito de melhorar a integridade do DNA extraído, uma segunda extração foi realizada com um tratamento prévio da amostra com o tampão TE pH9 (EDTA 1mM, Tris-Cl 10 mM, pH 9) por 24h, 37°C. Após a incubação, a extração de DNA genômico foi realizada como descrito no parágrafo anterior, utilizando 10-50 mg de tecido (coração, placenta e fetos).

4.22.2 PCR

O DNA de *T. cruzi* foi detectado por PCR, utilizando os primers TCZ1 (5'-CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT) e TCZ2 (5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG) (MOSER, 1989), que amplificam uma região de 180 pb. Adicionalmente, uma outra região de 330pb foi amplificada, utilizando os

primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTG) (STURM, 1989).

A PCR foi realizada com o uso do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega). Cada amostra foi composta de 25 μM GoTaq® Green Master Mix (20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0,2 mM de dNTP mix; 1,5 mM de $MgCl_2$, Taq polimerase), 20 pmol de cada primer, 100 ng de DNA e água DNAse free num volume total de 50 µl.

O DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE e visualizado sob luz UV com brometo de etídio (0,5µg/ml).

4.23 Análise estatística

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Parasitemia

A parasitemia das fêmeas prenhas foi realizada no 48° dia de infecção, correspondendo ao 18º dia da prenhez. Não foram detectadas formas tripomastigotas sanguíneas nas amostras de sangue das fêmeas prenhas infectadas e infectadas tratadas com sulfato de zinco.

5.2 Quantificação de óxido nítrico produzido por células do lavado da cavidade peritoneal

Culturas de células <u>não</u> estimuladas com LPS:

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas entre os grupos.

Culturas de células estimuladas com LPS:

Embora a análise estatística não tenha evidenciado alterações significantes entre os grupos, verificou-se um aumento nos níveis de nitrito nas prenhas infectadas e suplementadas com sulfato de zinco, em relação ao respectivo grupo sem tratamento.

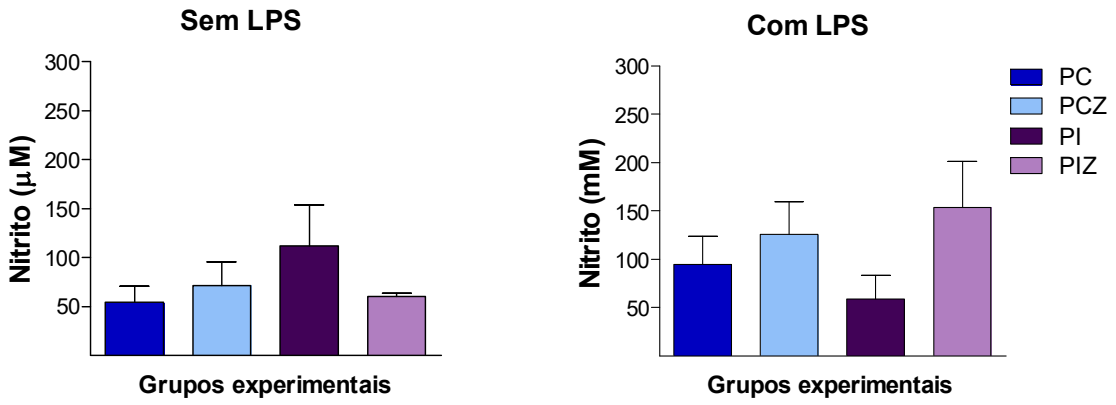


Figura 9. Concentrações de Nitrito (μM) em culturas de células peritoneais estimuladas ou não com LPS (10μg/mL), coletadas de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi,* nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.3 Avaliação da proliferação celular (ensaio de CFSE basal e em cultura de 5 dias)

Para a análise da proliferação celular, os esplenócitos foram previamente marcados com CFSE, uma molécula capaz de associar-se a proteínas do citoplasma celular e ser distribuída às gerações de células filhas de maneira uniforme, o que possibilita a detecção do aumento da proliferação, em função da queda da fluorescência nestas células.

Durante a infecção, foi possível observar um percentual significativamente menor de proliferação de linfócitos ($CFSE^{low}$) nas prenhas infectadas e suplementadas com zinco (PIZ), quando comparadas ao (PI). O grupo infectado e tratado com sulfato de zinco apresentou resposta linfoproliferativa semelhante aos grupos controles.

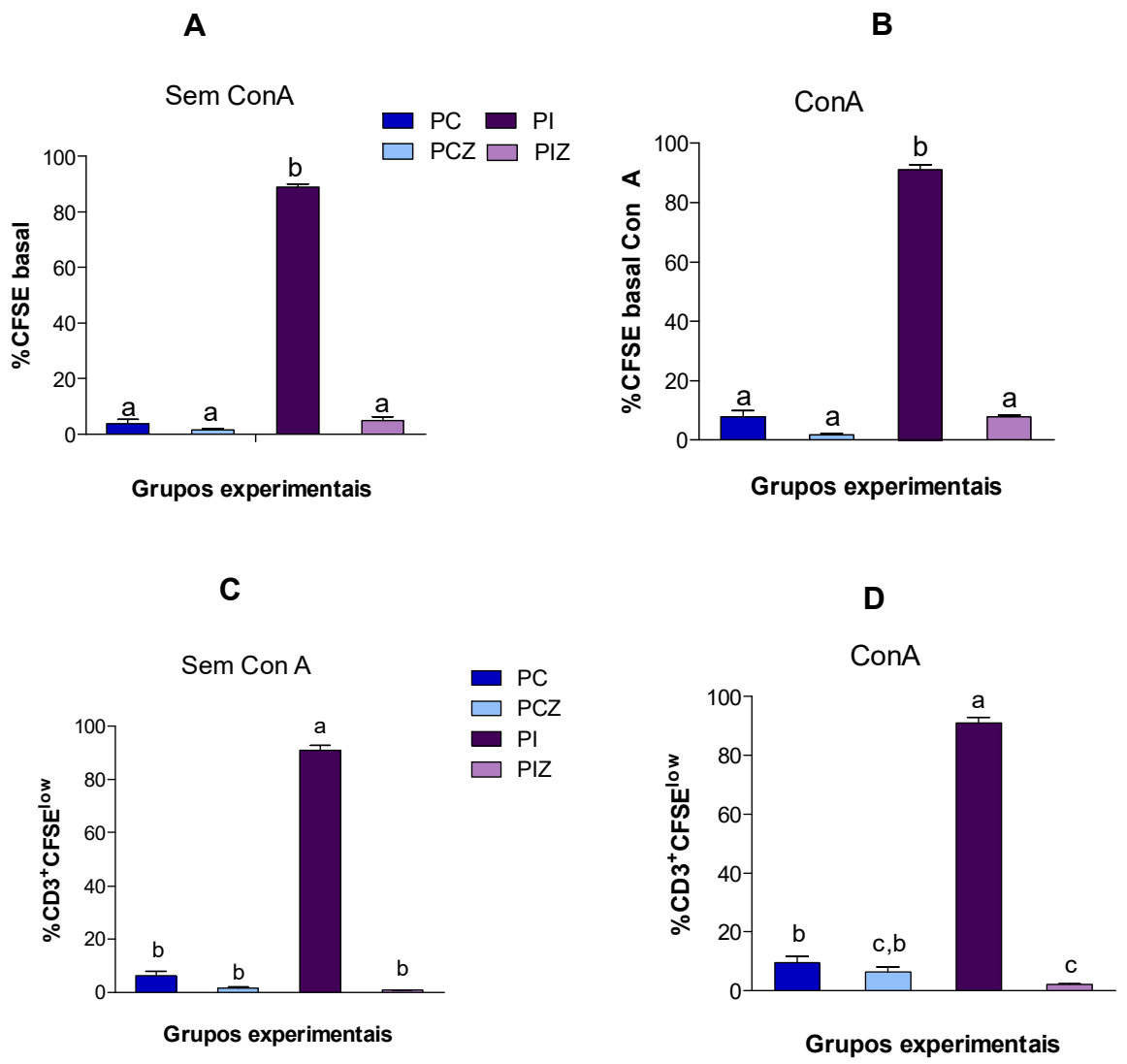


Figura 10. Representação gráfica da proliferação basal de esplenócitos marcados com CFSE **(A e B)**; Marcação de células $CD3^+$ provenientes do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* **(C e D)**, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Em **(C)**, amostras não estimuladas e em **(D)**, amostras estimuladas com Concanavalina A. As células marcadas com CFSE foram submetidas à incubação por 5 dias. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.4 Análise do processo de apoptose e viabilidade celular

As figuras mostram os resultados obtidos nos testes de apoptose observados nos estágios de apoptose inicial (marcação positiva para Anexina V e negativa para iodeto de propídeo), estágio tardio (marcação positiva para Anexina V e positiva para iodeto de propídeo) e células viáveis (marcação negativa para Anexina V e negativa para Iodeto de propideo). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados no estágio inicial de apoptose (Figura 11). Os resultados referentes ao estágio tardio de apoptose mostraram uma redução estatisticamente significante no grupo controle tratado com zinco (PCZ) quando comparado ao grupo controle sem tratamento (PC) (Figura 12). A comparação do perfil de células viáveis dos diferentes grupos experimentais não mostrou alterações na análise estatística (Figura 13).

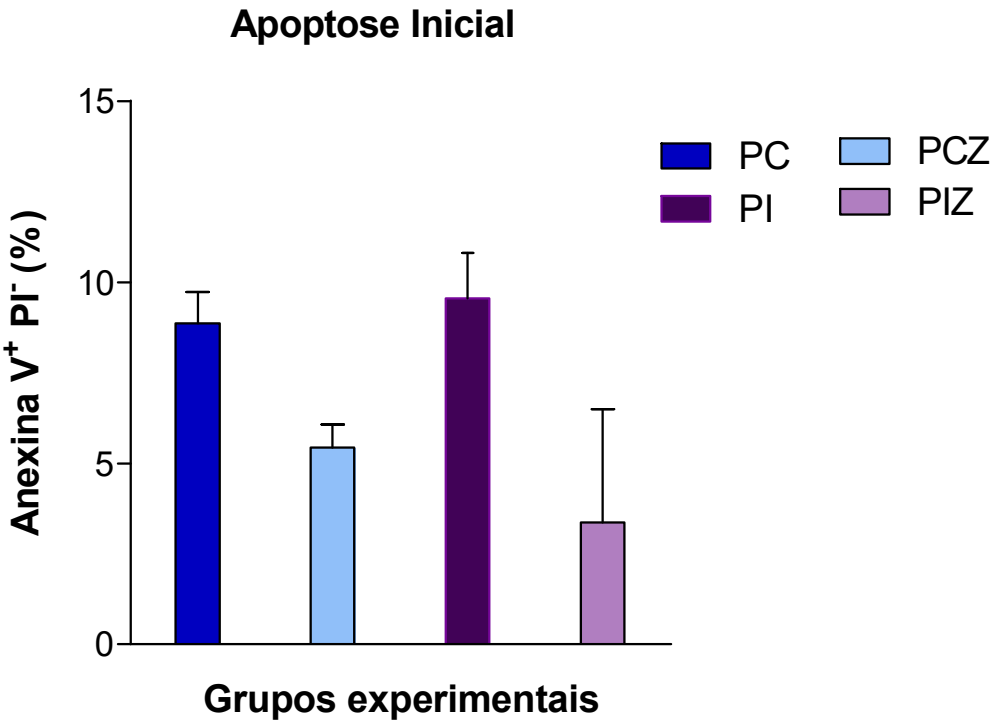


Figura 11. Marcação de células esplênicas de ratas Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). As células marcadas com anexina-V-FITC (Anexina V^+) e iodeto de propídeo negativo (PI^-) caracterizam o estágio de início de apoptose. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

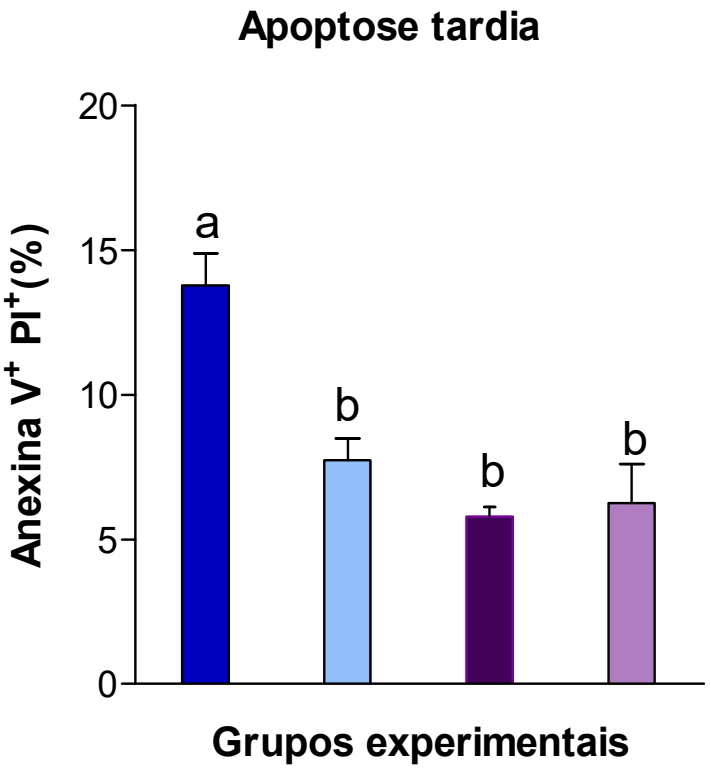


Figura 12. Marcação de células esplênicas de ratas Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). As células foram marcadas com anexina-V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

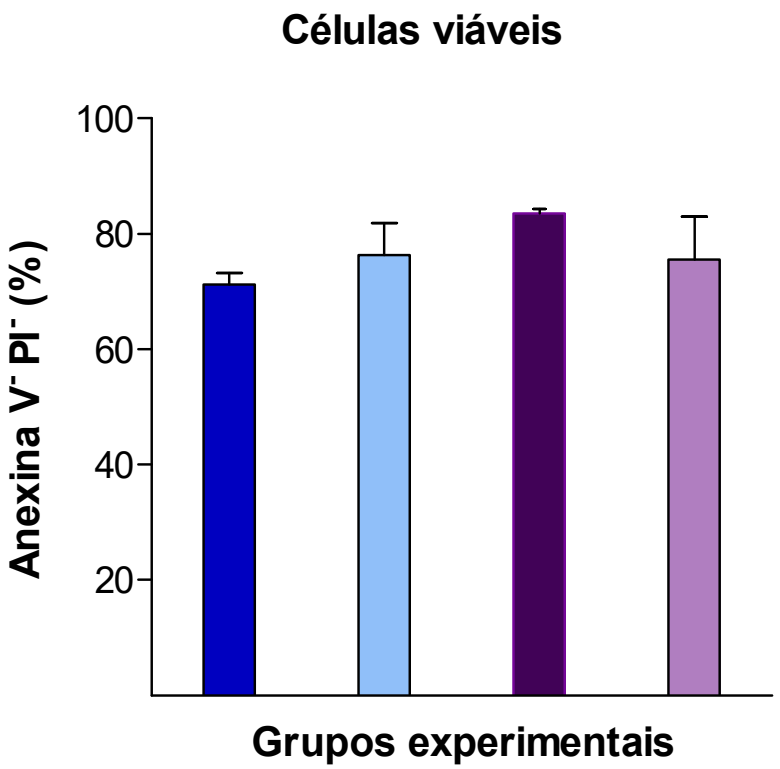


Figura 13. Marcação de células esplênicas de ratas Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). A marcação negativa para Anexina V e iodeto de propídeo mostram o perfil de células viáveis. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

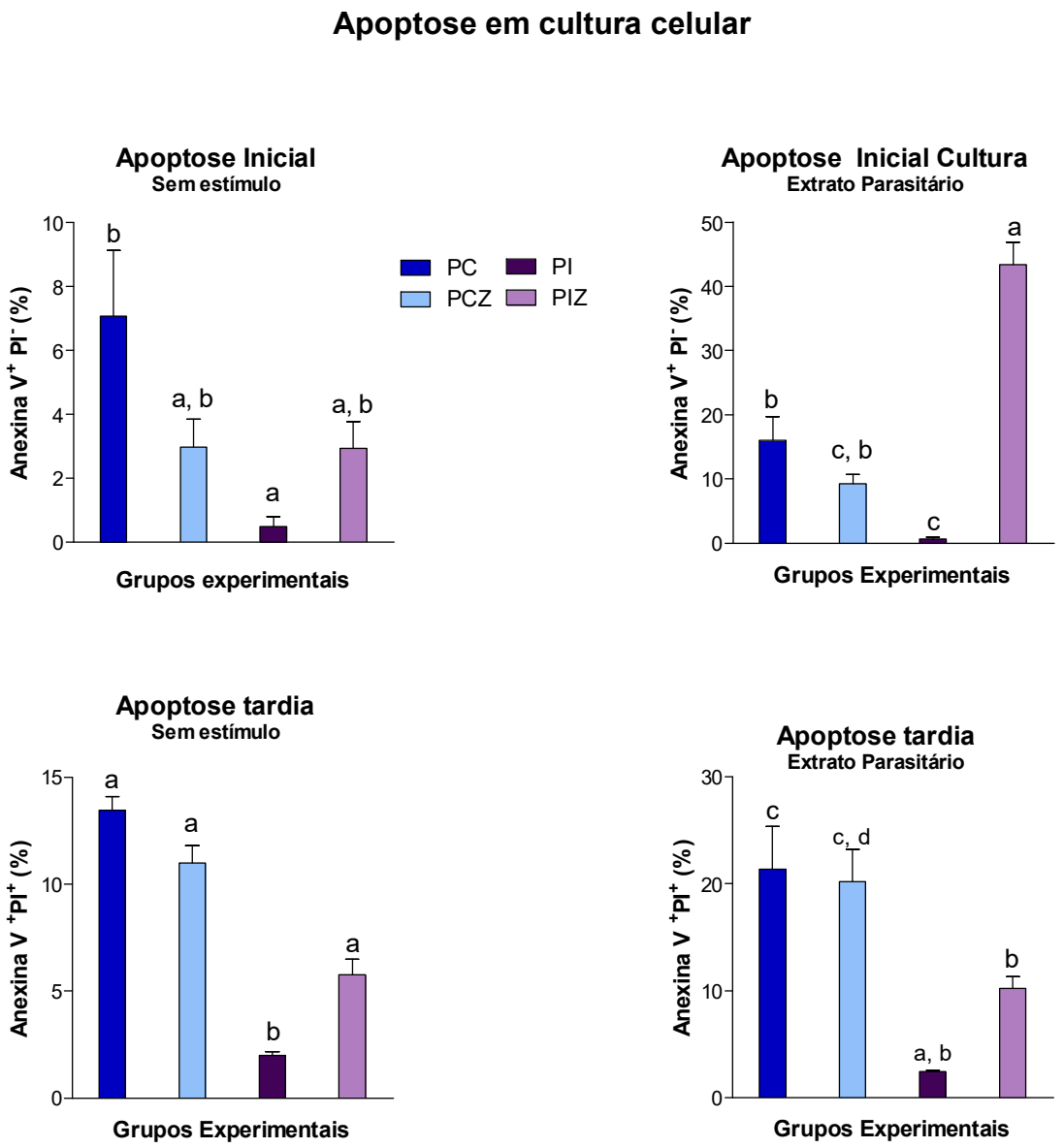


Figura 14. Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, nos seguintes grupos: Prenhas Controle (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ), As células foram marcadas com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose **(A e B)** e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose **(C e D)**. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

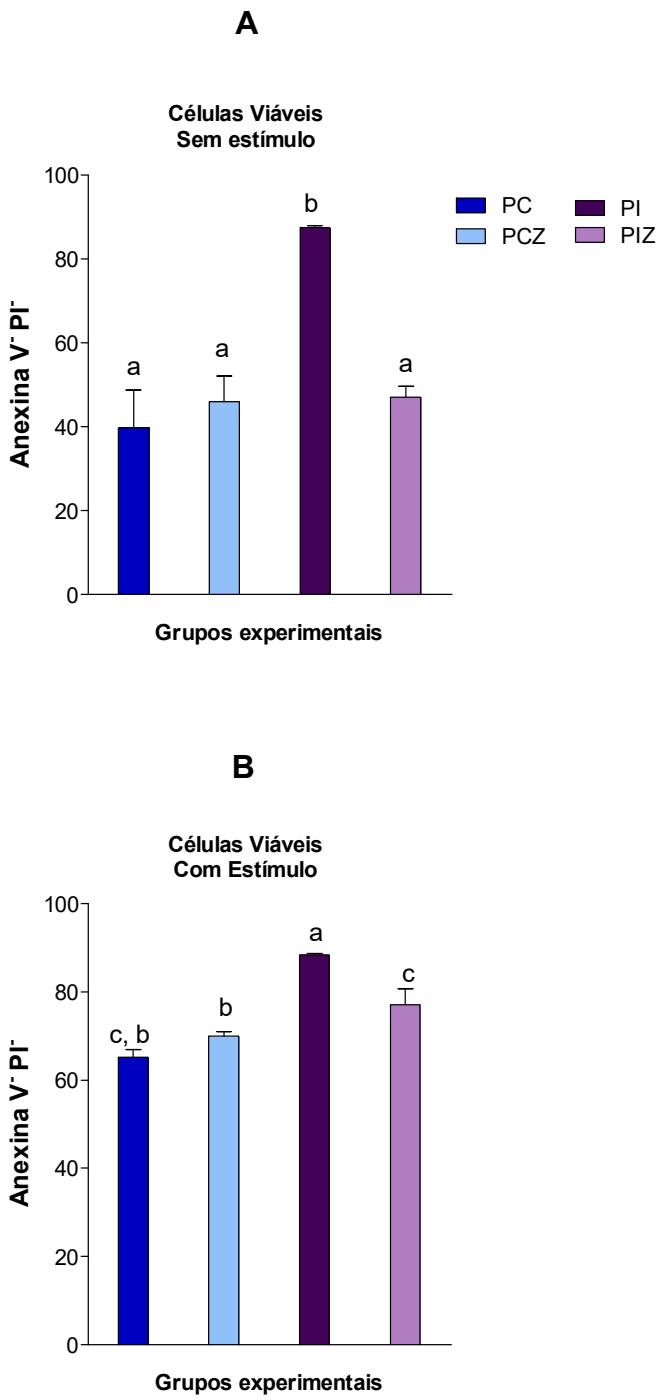


Figura 15. Marcação de células esplênicas em cultura, não estimuladas **(A)** ou estimuladas **(B)** com extrato parasitário (25µg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Gráficos A e B: análise do percentual de células viáveis (anexina V $FITC^{-}PI^{-}$). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.5 Análise do percentual de células apresentadoras de antígenos (CD11 b/c+) presentes na maioria dos monócitos, granulócitos, macrófagos e células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal

As células do lavado peritoneal, obtidas das ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com zinco, apresentaram aumento significante na porcentagem de células CD11bc$^+$ quando comparadas ao grupo infectado sem tratamento (Figura 16).

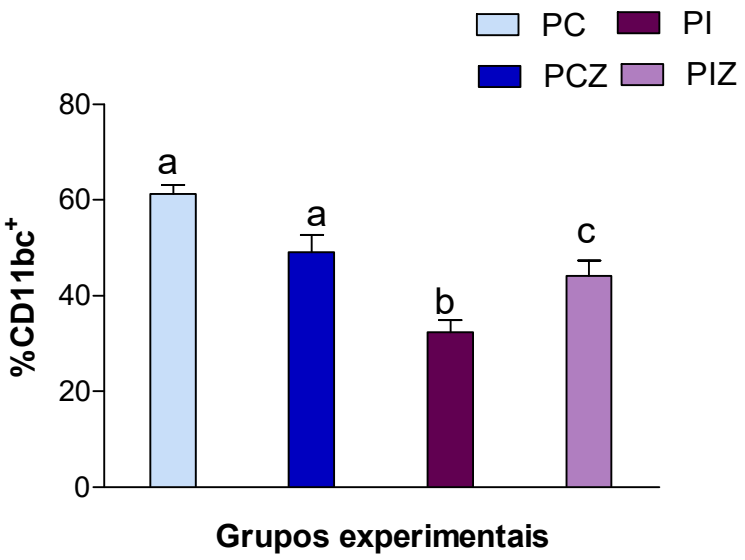


Figura 16. Células apresentadoras de antígenos (CD11b/c$^+$), obtidas a partir do lavado peritoneal de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p<0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.6 Análise da expressão de RT1B em macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram avaliados mediante a marcação da expressão do antígeno RT1B (MHC classe II, I-A equivalent).

O grupo das prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ) apresentou aumento significativo no percentual na expressão da molécula RT1B, quando comparado aos demais grupos (PC, PCZ e PI) (Figura 17).

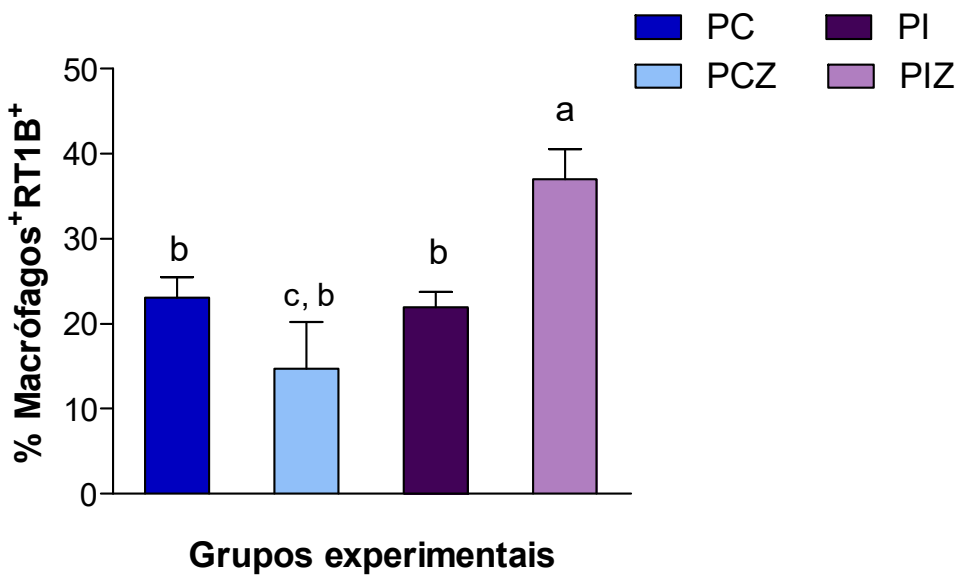


Figura 17. Representação gráfica dos níveis de expressão do antígeno RT1B (MHC classe II, I-A equivalent) em macrófagos obtidos a partir do lavado peritoneal de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.7 Análise do percentual de células apresentadoras de antígenos (CD11 b/c+) e expressão de CD80 e CD86

Em relação à análise da expressão de moléculas coestimulatórias em APCs coletadas do baço, os resultados obtidos demonstraram que houve um aumento estatisticamente significante na expressão de CD80 e CD86 nas células das prenhas infectadas e suplementadas com sulfato de zinco (PIZ), quando comparadas às prenhas dos demais grupos (Figura 18).

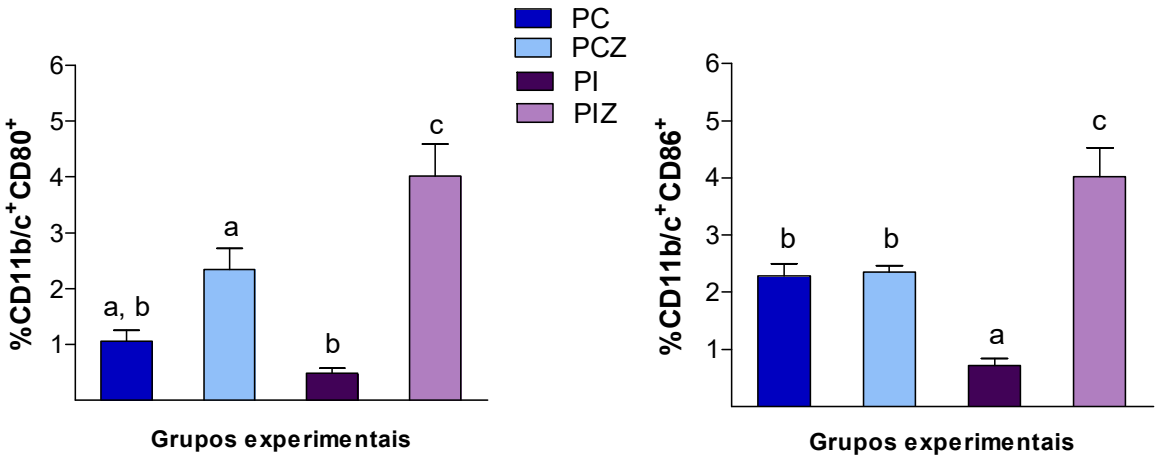


Figura 18. Representação gráfica dos níveis de expressão das moléculas CD80 **(A)** e CD86 **(B)** em células CD11b/c$^+$, obtidas a partir baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p<0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.8 Análise do percentual de Linfócitos B (CD45RA⁺)

Conforme observado na figura a seguir, o grupo de prenhas infectadas e suplementadas com sulfato de zinco (PIZ) apresentou uma redução estatisticamente significante na expressão de CD45RA, quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI) (Figura19).

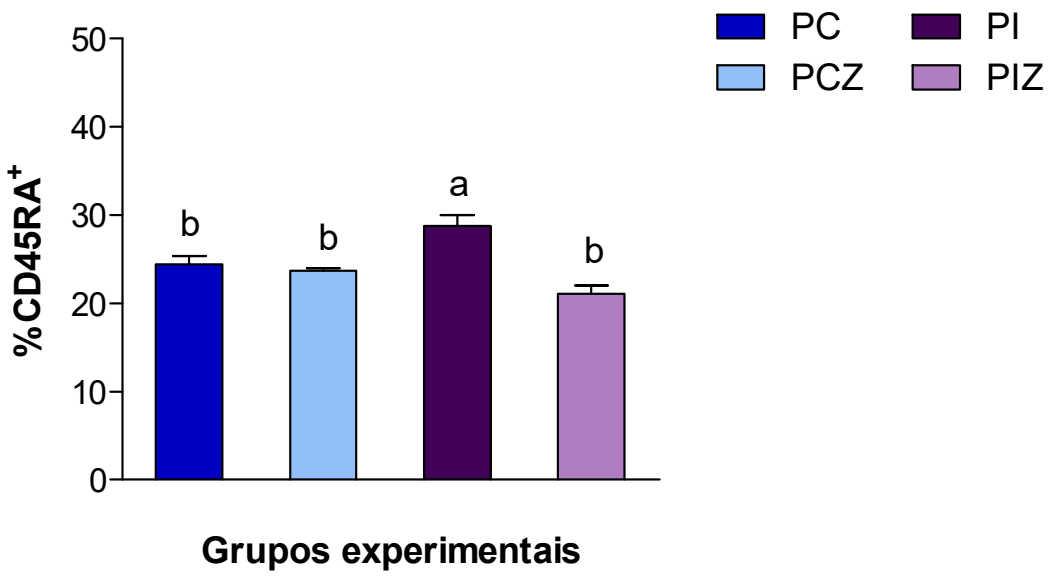


Figura 19. Representação gráfica dos níveis de expressão da molécula CD45RA (marcador de linfócito B) em células obtidas a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanos19oma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.9 Análise fenotípica do percentual de células NK (CD161⁺) e NKT (CD3⁺CD161⁺)

A administração de sulfato de zinco não resultou em alteração estatisticamente significativa no percentual de células NK nos diferentes grupos. Em relação às células NKT, o grupo infectado suplementado com sulfato de zinco apresentou uma redução estatisticamente significante no percentual destas células em relação ao grupo infectado sem tratamento (PI) (Figura 20).

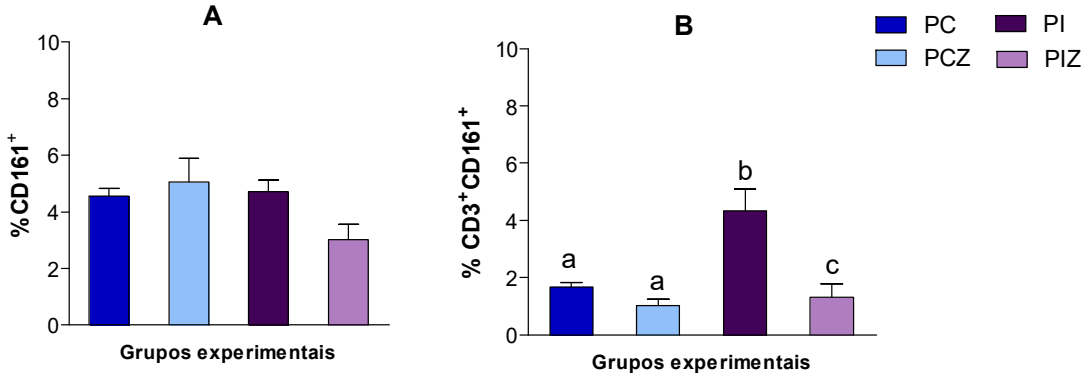


Figura 20. Análise do percentual de células NK **(A)** e NKT **(B)**, obtidas a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média ± erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p<0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.10 Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

As prenhas infectadas submetidas a suplementação com sulfato de zinco (PIZ) apresentaram uma redução estatisticamente significante no percentual de linfócitos TCD4⁺ quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI).

Em relação às células TCD8⁺, o grupo infectado e tratado (PIZ) também mostrou uma redução significativa destas células quando comparado ao grupo sem suplementação (PI) (Figura 21).

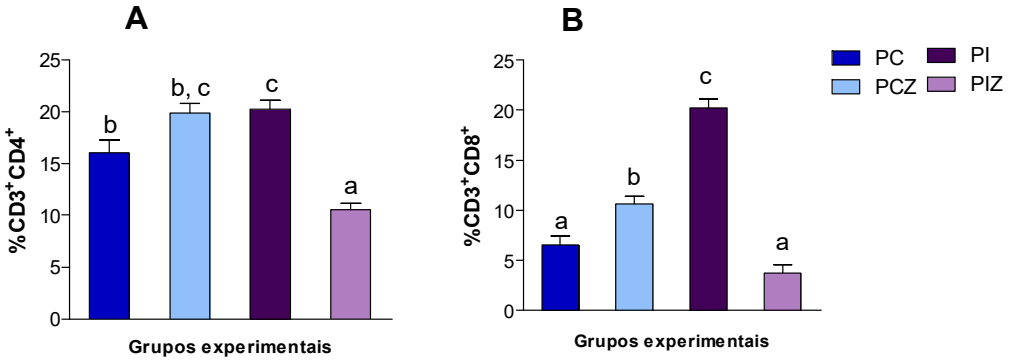


Figura 21. Análise das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ **(A)** e T CD3⁺CD8⁺ **(B)** no baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p<0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.11 Expressão de moléculas CD28 e CD11a nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

A molécula CD28 é expressa na superfície de células TCD4⁺ e TCD8⁺ e constitui o segundo sinal para ativação e regulação de linfócitos T (WANG & CHEN, 2004; MAGALHÃES et al., 2015). Além disso, analisamos a expressão de LFA-1 (CD11a), uma integrina envolvida no processo de adesão celular, com importância crucial no processo de formação do conjugado de células T citotóxicas e seus alvos (DAVIGNON, 1981).

Nossa análise CD28 mostrou que as fêmeas prenhas infectadas e tratadas com zinco apresentaram uma redução significativa da expressão deste marcador nas células TCD8⁺. Em relação às células TCD4, a expressão deste marcador não apresentou nenhuma alteração significante no grupo PIZ quando comparado ao grupo PI. Como pode ser observado nas figuras a seguir, durante a prenhez, a infecção provocou um aumento na expressão da molécula CD11a em linfócitos T CD4⁺ (PI). No grupo infectado e suplementado com sulfato de zinco (PIZ) foi observada uma redução na expressão da molécula CD11a, com percentuais semelhantes aos grupos de prenhas controles, sem infecção (PC e PCZ).

Em relação à expressão da molécula CD11a em linfócitos T CD8⁺, verificou-se aumento estatisticamente significativa no grupo controle suplementado com sulfato de zinco (PCZ), com elevado percentual quando comparado ao grupo de prenhas controles sem suplementação (Figura 22).

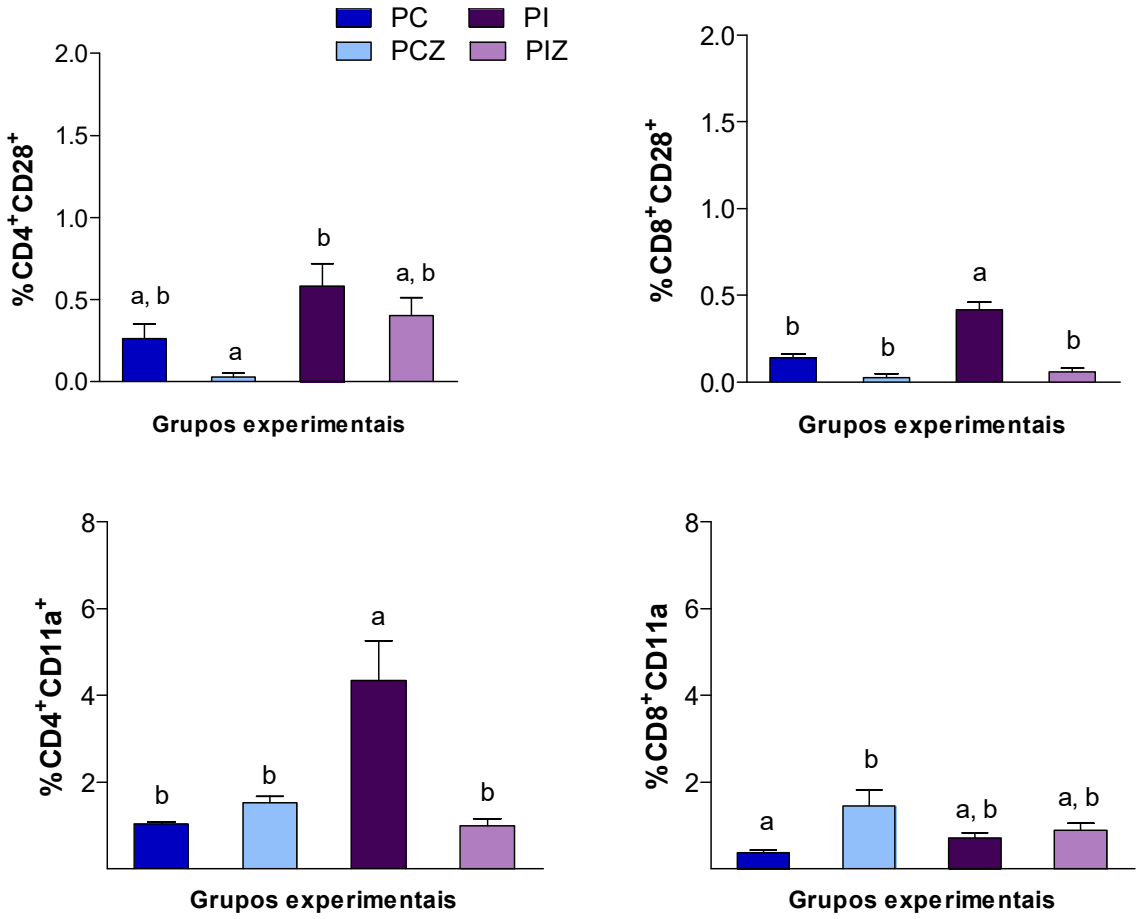


Figura 22. Análise do percentual de linfócitos T $CD4^+CD28^+$ **(A)**, T $CD4^+CD11a^+$ **(B)**, T $CD8^+CD28^+$ **(C)** e T $CD8^+CD11a^+$ **(D)** em células esplênicas de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p<0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.12 Análise de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3^{high}

Verificou-se que o percentual de células $CD4^{+}CD25^{+}$ que expressavam FoxP3 foi maior no grupo de prenhas infectadas sem tratamento (PI), quando comparado com os demais grupos. Desta forma, as prenhas infectadas submetidas à administração diária de sulfato de zinco (PIZ) apresentaram redução no percentual de células T reguladoras, quando comparadas às prenhas infectadas, sem suplementação (Figura 23).

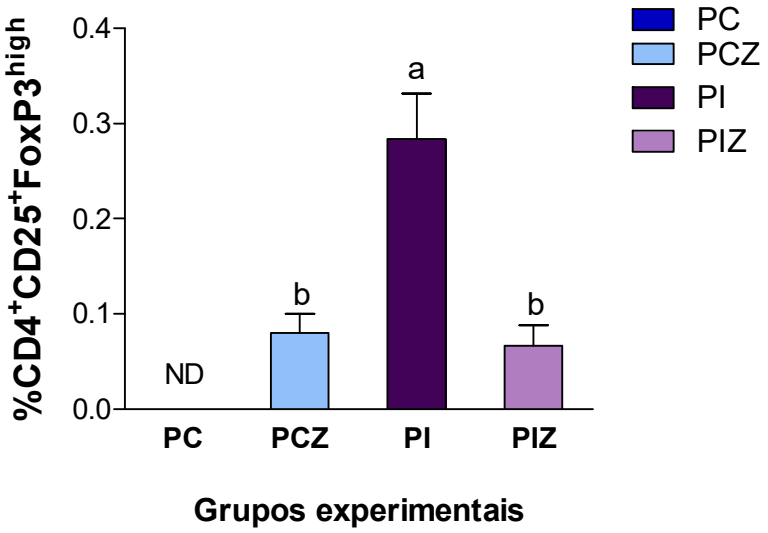


Figura 23. Representação gráfica dos níveis de expressão de FoxP3 nas células T $CD4^{+}CD25^{high}$ obtidas a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi,* nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni). ND: níveis não detectáveis.

5.13 Análise do fenótipo CD62L^{Low} CD44^{high}

Sabe-se que as células T naive e ativadas expressam diferentes moléculas de adesão. Duas dessas moléculas de adesão estão associadas a células T naive e memória: CD62L (L-selectin) e CD44 (H-CAM).

O grupo de prenhas infectadas sem tratamento (PI) apresentou maior percentual de linfócitos TCD4^{+} expressando em sua superfície o fenótipo CD62L^{low}CD44^{high}, quando comparado aos demais grupos (PC, PCZ e PIZ). No grupo de prenhas infectadas submetidas à suplementação com sulfato de zinco, os níveis desta subpopulação de linfócitos foram indetectáveis (Figura 24).

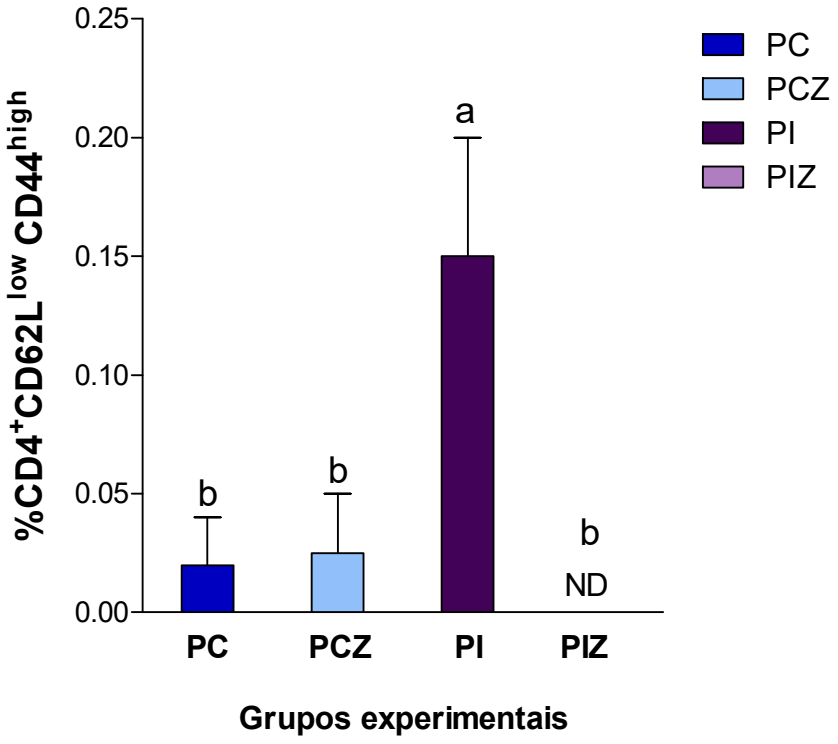


Figura 24. Representação gráfica dos níveis de expressão de CD62L^{low} e CD44^{high} em linfócitos T CD4^{+} obtidos a partir do baço de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni). ND: níveis não detectáveis.

5.14 Detecção intracelular das citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α em linfócitos T CD4+ e CD8+

Os resultados descritos abaixo se referem à produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α, a partir de linfócitos esplênicos das prenhas infectadas ou não por *T. cruzi*. As células foram estimuladas previamente *in vitro* com PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) e ionomicina.

A análise das células $TCD4^+$ produtoras de IL-4 e IFN-γ revelou que as prenhas do grupo infectado e tratado com zinco (PIZ) apresentaram um discreto aumento na produção destas citocinas, quando comparadas ao grupo sem tratamento (PI).

Em contrapartida, a avaliação dos dados também demonstrou uma redução significativa na produção de TNF-α nas prenhas do grupo infectado e tratado com zinco (PIZ), quando comparado ao grupo infectado e não suplementado (PI).

No 48° dia da infecção não foi observada nenhuma alteração significativa na produção de IL-10 por células T $CD4^+$, quando comparadas as prenhas infectadas suplementadas e não suplementadas (Figura 25).

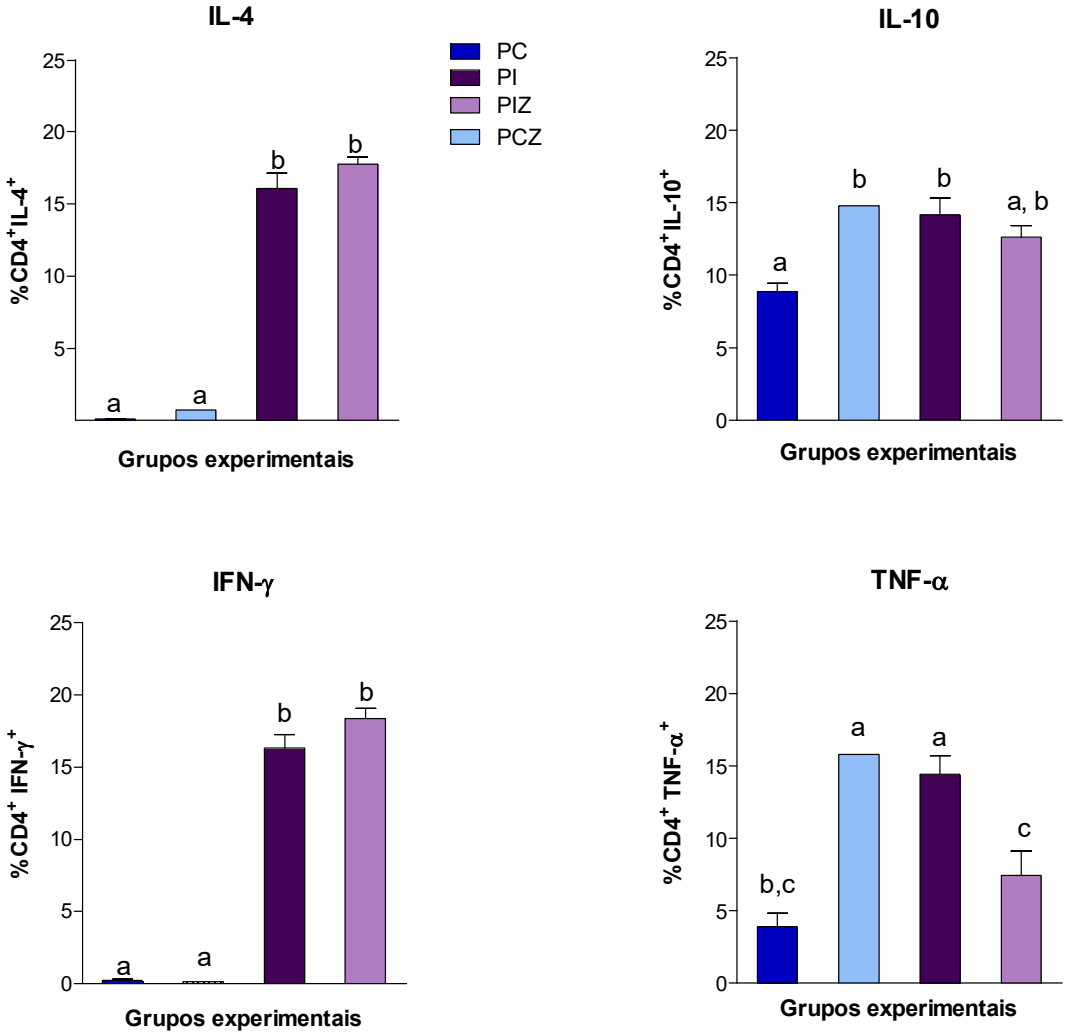


Figura 25. Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T $CD4^+$ esplênicos de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

Em relação aos linfócitos T $CD8^+$, as prenhas dos grupos infectados tratados com zinco (PIZ) apresentaram maiores percentuais de células T $CD8^+IL\text{-}4^+$ em relação aos animais infectados sem tratamento (PI).

Em relação aos linfócitos T $CD8^+$ produtores de IL-10 as prenhas infectadas e tratadas com sulfato de zinco (PI) revelaram um ligeiro aumento na porcentagem destas células, embora não significante quando comparado ao grupo PI.

De maneira similar aos linfócitos $TCD4^+$, houve uma diminuição da produção de TNF-α nas prenhas do grupo infectado tratado com zinco (PIZ), quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI) (Figura 26).

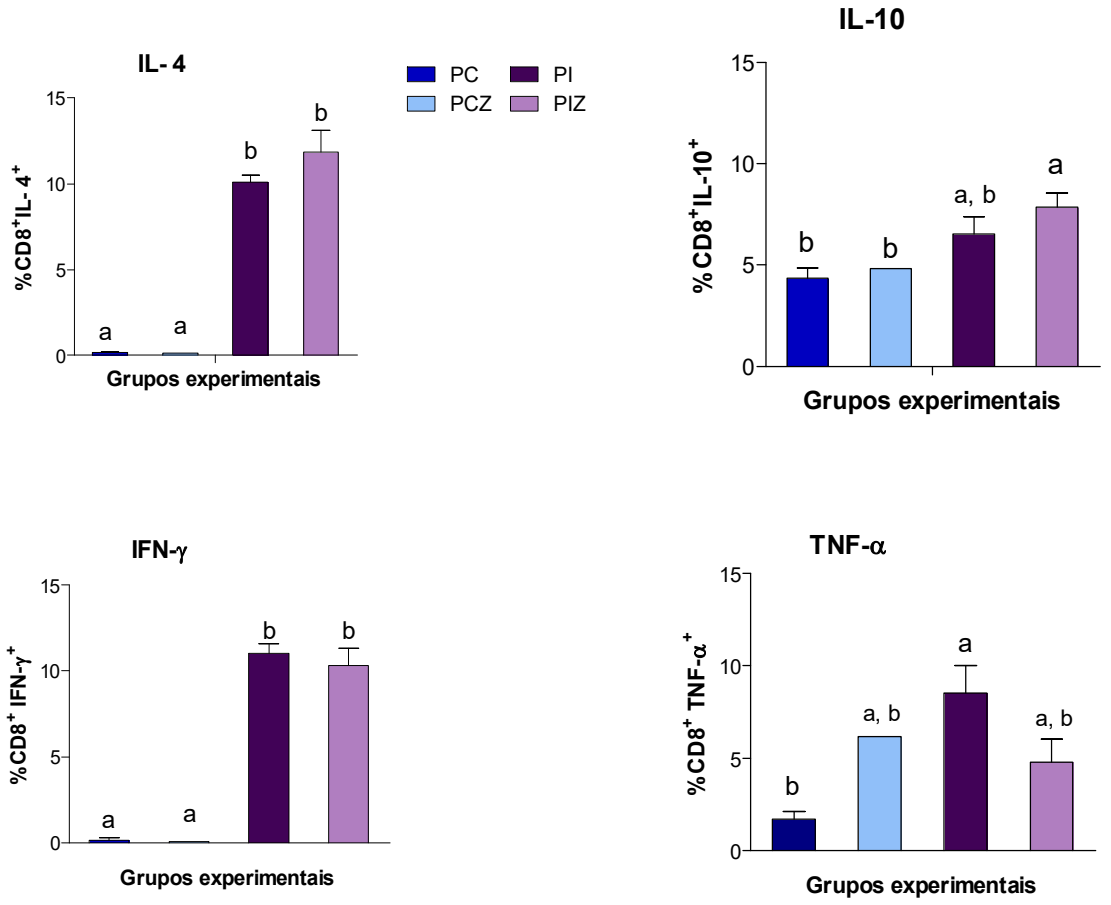


Figura 26. Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T CD8$^+$ esplênicos ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.15 Produção de MCP-1 por linfócitos esplênicos

No 48° dia da infecção, a produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos TCD4$^+$ foi estatisticamente maior nas prenhas suplementadas com sulfato de zinco (PIZ), quando comparadas às prenhas não suplementadas (PI). No entanto, a administração de zinco não alterou os percentuais de MCP-1 produzida por linfócitos TCD8$^+$ (Figura 27).

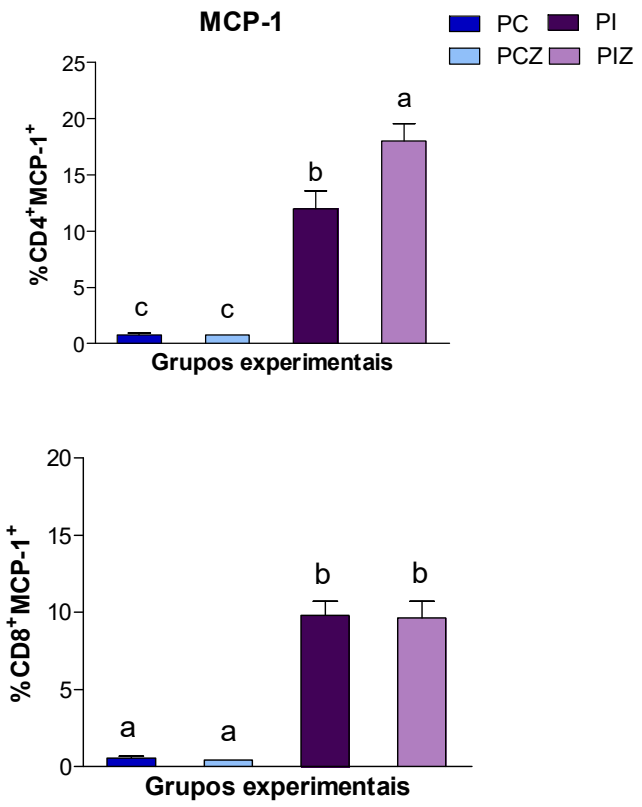


Figura 27. Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD4+ e CD8+ esplênicos de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da édia. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16 Quantificação de citocinas no soro de ratas Wistar prenhas nos diferentes grupos experimentais utilizando kits ELISA (IL- 2, IL-4, IL-6, IL- 10, IL- 12, IL-17, TNF-α e TGF- β).

5.16.1 IFN-γ

A Figura 28 mostra a dosagem de IFN-γ nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle sem tratamento (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

Os resultados das dosagens mostram uma diminuição na concentração sérica de IFN-γ no grupo infectado tratado com zinco (PIZ) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI), no 48° dia da infecção.

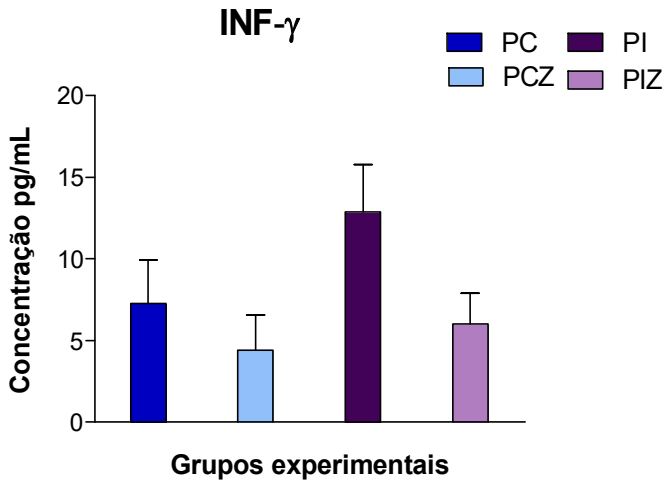


Figura 28. Quantificação da citocina IFN-γ no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.2 TNF-α

A Figura 29 a seguir mostra a as concentrações de TNF-α nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle sem tratamento (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

Muito embora não tenha sido observadas diferenças estatísticas significantes, o resultado mostra uma diminuição na concentração desta citocina no soro das fêmeas do grupo tratado com sulfato de zinco quando comparado ao grupo infectado sem tratamento, no 48º dia da infecção.

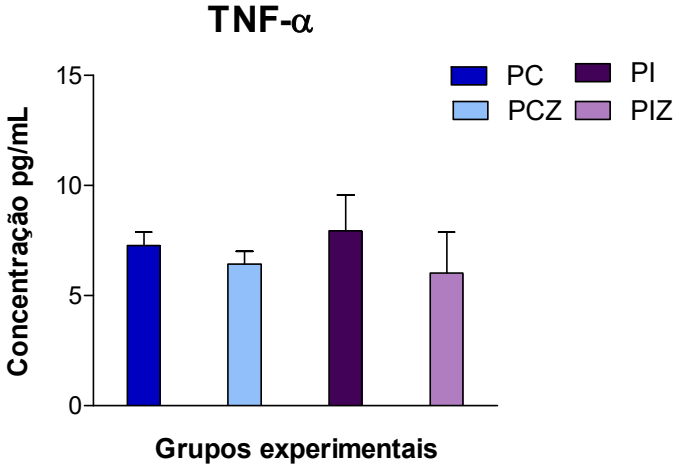


Figura 29. Quantificação da citocina TNF-α no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.3 IL-4

O gráfico abaixo representa dosagem de IL-4 no soro das prenhas nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

Observa-se nesse resultado que as dosagens desta citocina nos diferentes grupos experimentais não demonstraram diferenças estatisticamente significantes no 48° dia de infecção.

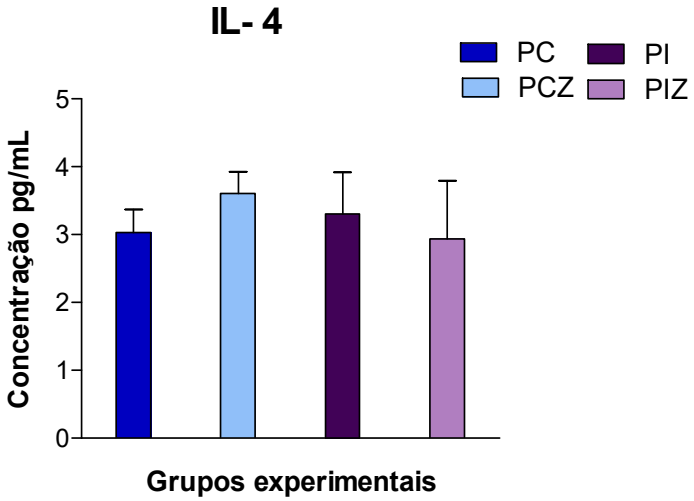


Figura 30. Quantificação da citocina IL-4 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.4 IL-10

A figura 31 mostra a dosagem de IL-10 nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

A análise estatística não mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos analisados, contudo é possível observar um ligeiro aumento de IL-10 no soro das ratas infectadas tratadas com zinco (PIZ) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI), no 48º dia da infecção (18º dia da prenhez).

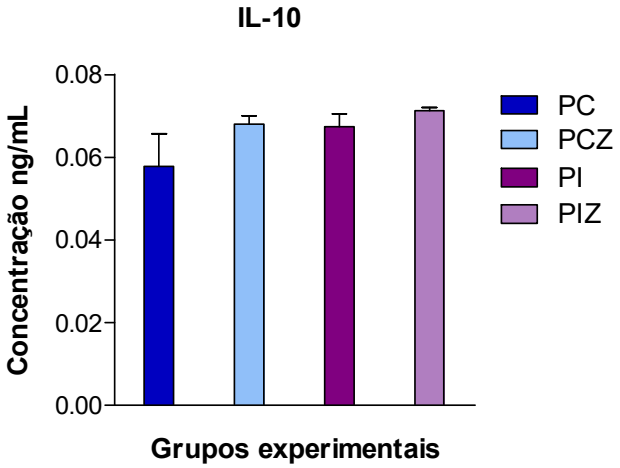


Figura 31. Quantificação da citocina IL-10 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controle (PC), da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.5 IL-2

A Figura 32 mostra as concentrações de IL-2 nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

O resultado observado mostra um aumento estatisticamente significante na concentração desta citocina no soro das fêmeas do grupo tratado com sulfato de zinco quando comparado ao grupo infectado sem tratamento, no 48º dia da infecção (18º dia da prenhez).

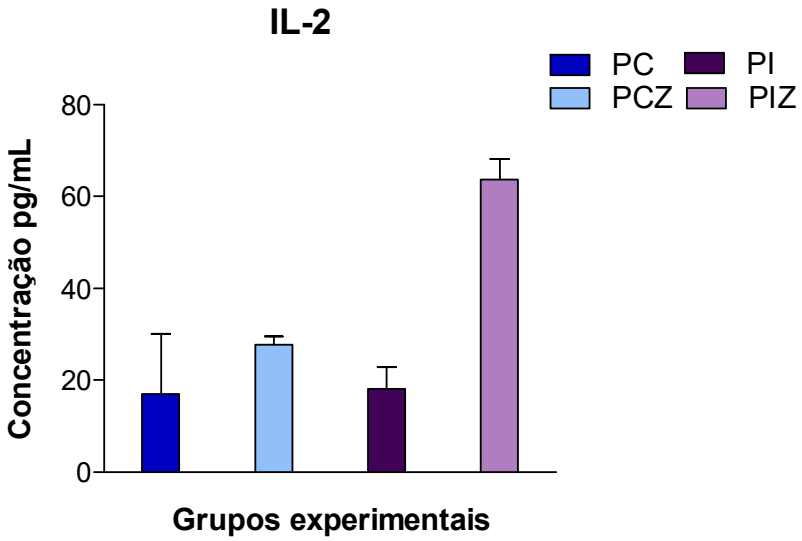


Figura 32. Quantificação da citocina IL--2 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.6 IL-6

O gráfico abaixo mostra a dosagem de IL-6 no soro das prenhas nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

Embora não haja diferenças estatisticamente siginificantes entre os grupos, este resultado mostra uma diminuição da concentração de IL-6 no soro das prenhas pertencentes ao grupo infectado e suplementado com sulfato de zinco (PIZ) quando comparado ao grupo infectado não tratado (PI).

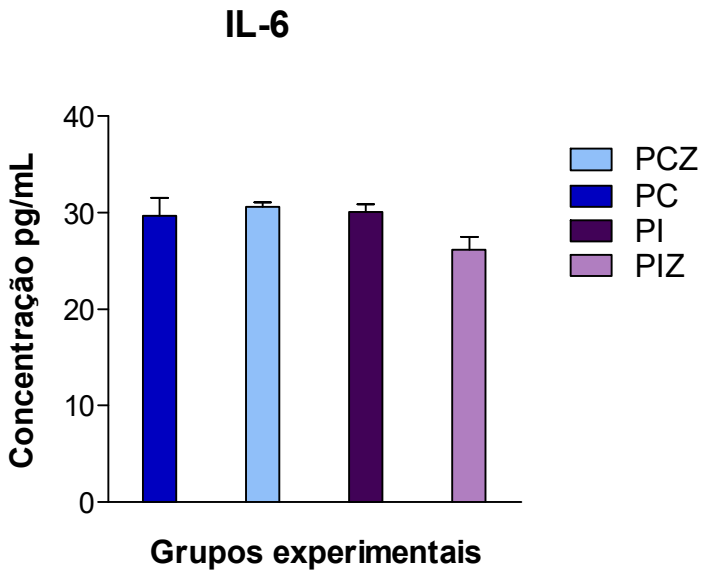


Figura 33. Quantificação da citocina IL-6 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.7 IL-12

A Figura 34 mostra a dosagem de IL-12 nos seguintes grupos experimentais: Prenhas controle (PC), Prenhas controle tratadas com zinco (PCZ), Prenhas infectadas (PI), Prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ).

Muito embora não tenhamos observado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, é possível observar uma elevação de IL-12 no soro das ratas infectadas tratadas com zinco (PIZ) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI). O aumento também é observado no grupo controle tratado com zinco (PCZ)

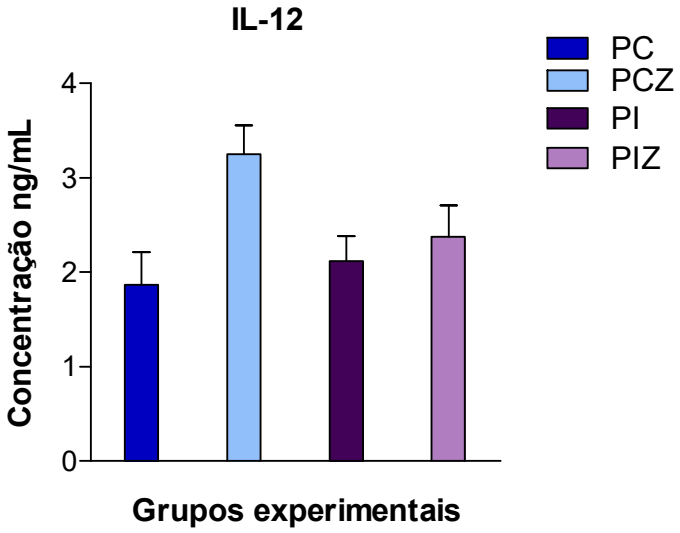


Figura 34. Quantificação da citocina IL- 12 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.8 IL-17

A Figura 35 mostra as dosagens de IL-17 no soro das prenhas nos grupos diferentes experimentais analisados.

Observa-se que a dosagem desta citocina apresentou um aumento estatisticamente significante no soro das ratas infectadas tratadas com zinco (PIZ) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (PI), no 48º dia da infecção (18º dia da prenhez).

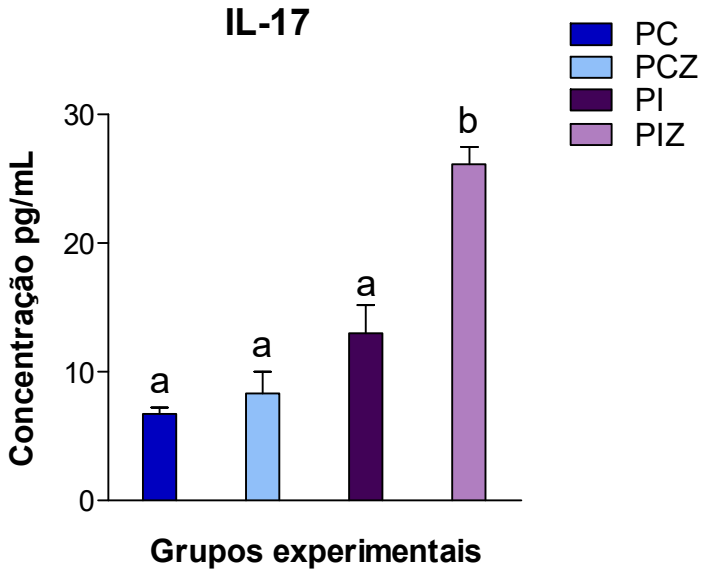


Figura 35. Quantificação da citocina IL- 17 no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.16.9 TGF-β

O gráfico abaixo mostra as concentrações de IL-6 no soro das fêmeas prenhas. Embora não haja diferença estatisticamente significante entre os grupos, este resultado mostra um claro aumento da concentração de TGF-β no soro das prenhas pertencentes ao grupo infectado e suplementado com sulfato de zinco (PIZ). Os testes foram realizados, no 48º dia da infecção (18º dia da prenhez).

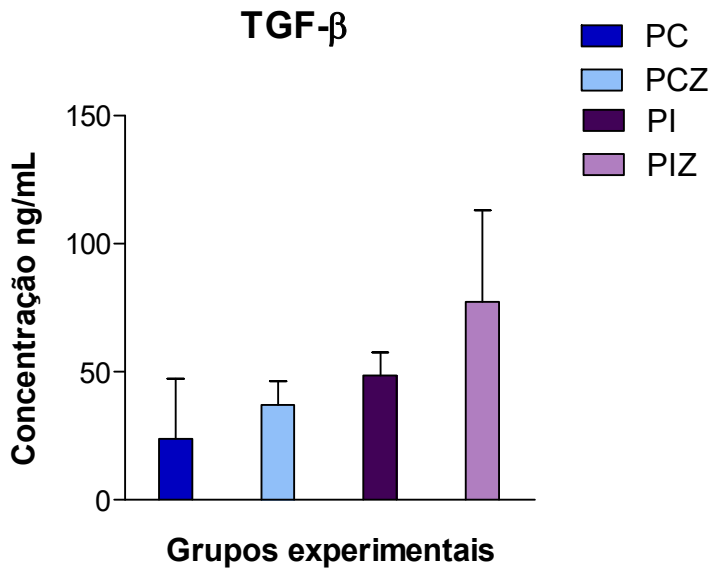


Figura 36. Quantificação da citocina TGF-β no soro de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.17 Dosagem de corticosterona plasmática pelo método de ELISA

As dosagens de corticosterona não mostraram alterações estatisticamente significativas na comparação entre o grupo tratado com zinco e o grupo sem tratamento (Figura 37).

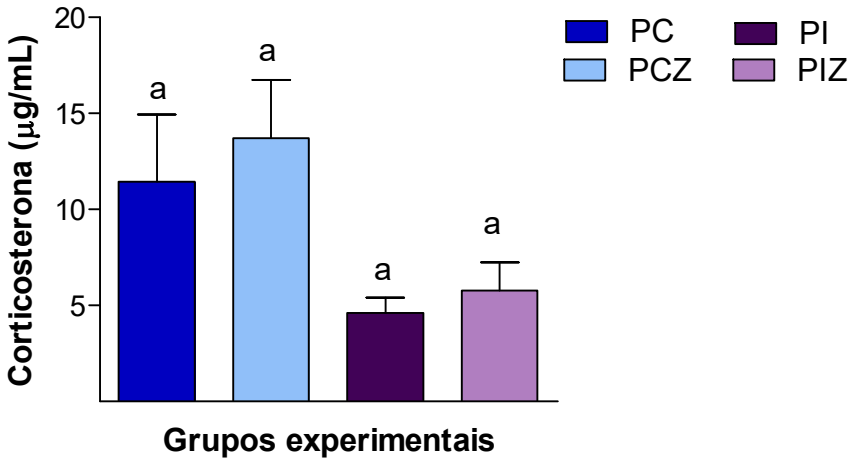


Figura 37. Quantificação dos níveis plasmáticos de corticosterona de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.18 Dosagem de Zinco sérico (HPLC)

O gráfico abaixo mostra a dosagem de zinco sérico de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi.*

As dosagens correspondem às concentrações de zinco (ug/mL) presente no plasma desses animais no 48° dia da infecção, 18° dia da prenhez.

Não observamos alterações estatisticamente significantes entre os grupos analisados.

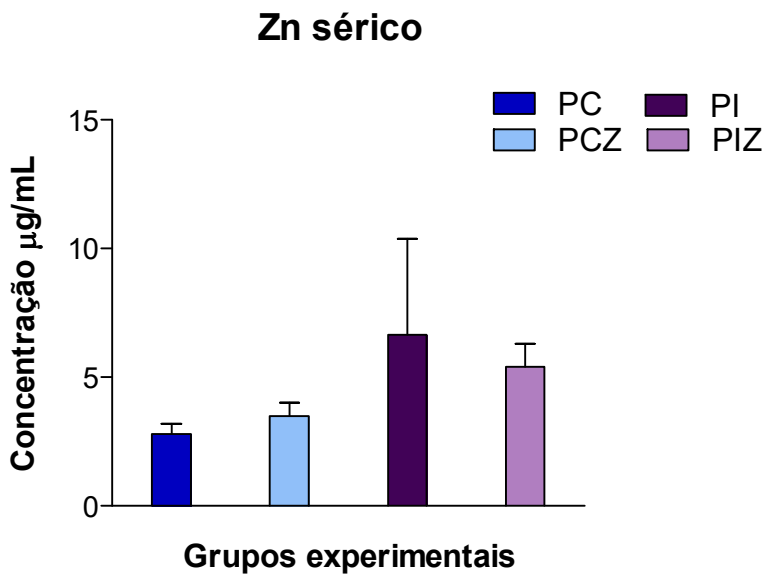


Figura 38. Quantificação dos níveis plasmáticos de zinco de ratas Wistar prenhas infectadas ou não com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e post-test Bonferroni).

5.19 Análise morfológica

5.19.1 Peso e diâmetro placentário

Os gráficos abaixo mostram o peso e diâmetros das placentas dos animais infectados e tratados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nesta análise morfológica.

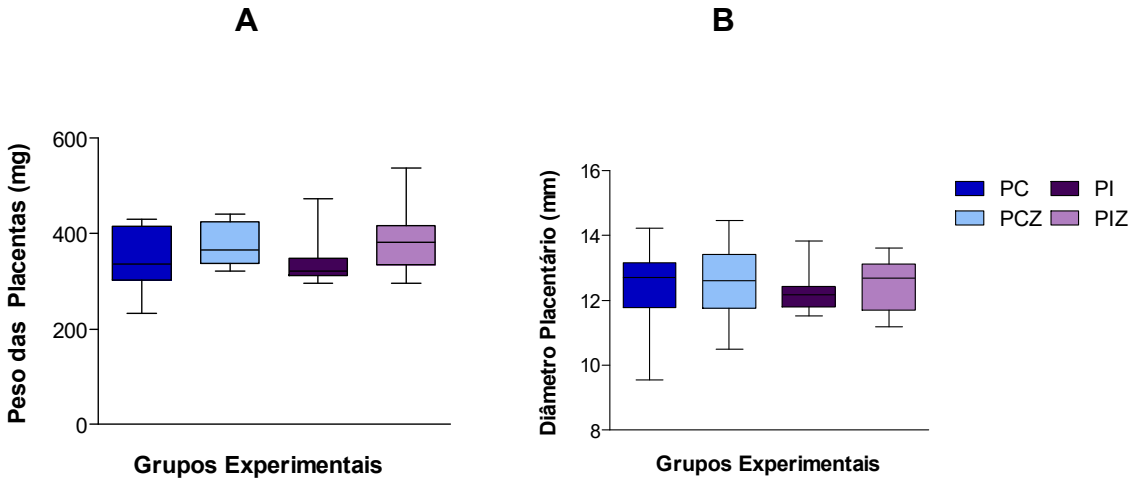


Figura 39. Peso e diâmetro placentários **(A e B)** de ratas Wistar prenhas infectadas ou não por cepa Y de *T.cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em mediano (valores máximo e mínimo). Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.19.2 Peso e comprimento fetal

Os gráficos abaixo mostram a análise morfológica dos fetos.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o peso e comprimento desses animais.

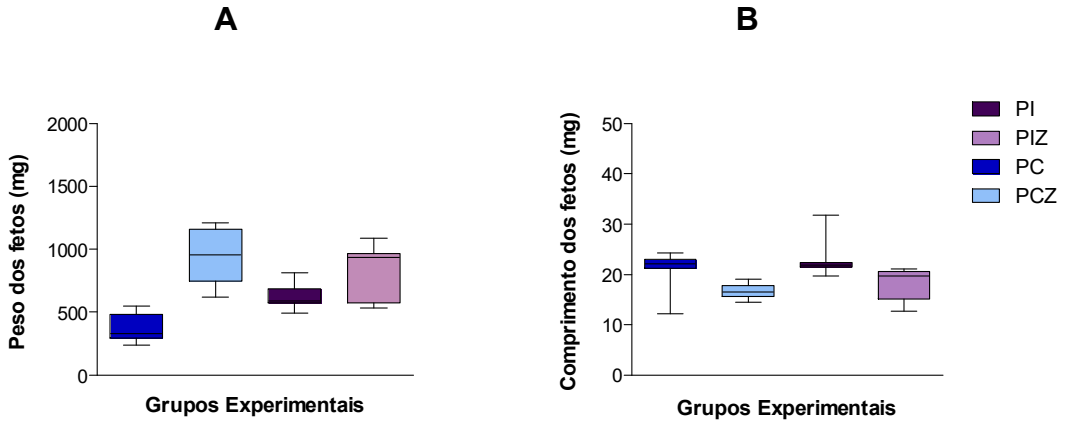


Figura 40. Peso e comprimento dos fetos **(A e B)** de ratas Wistar prenhas infectadas ou não por cepa Y de *T.cruzi*, nos seguintes grupos: Prenhas Controles (PC), Prenhas Controles tratadas com Zinco (PCZ), Prenhas Infectadas (PI) e Prenhas Infectadas tratadas com Zinco (PIZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em mediano (valores máximo e mínimo). Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.20 Detecção de DNA de T. cruzi em tecido fixado

5.20.1 Primeira extração de DNA em tecido fixado (placentas)

A Figura mostra a extração direta de DNA em tecido fixado (placenta) em formol 3,72%. Nesta extração não houve tratamento prévio da amostra. Por esta razão, verificamos apenas o aparecimento de um rastro tênue de DNA fragmentado nas duas amostras extraídas (Figura 41, poços 2 e 3)

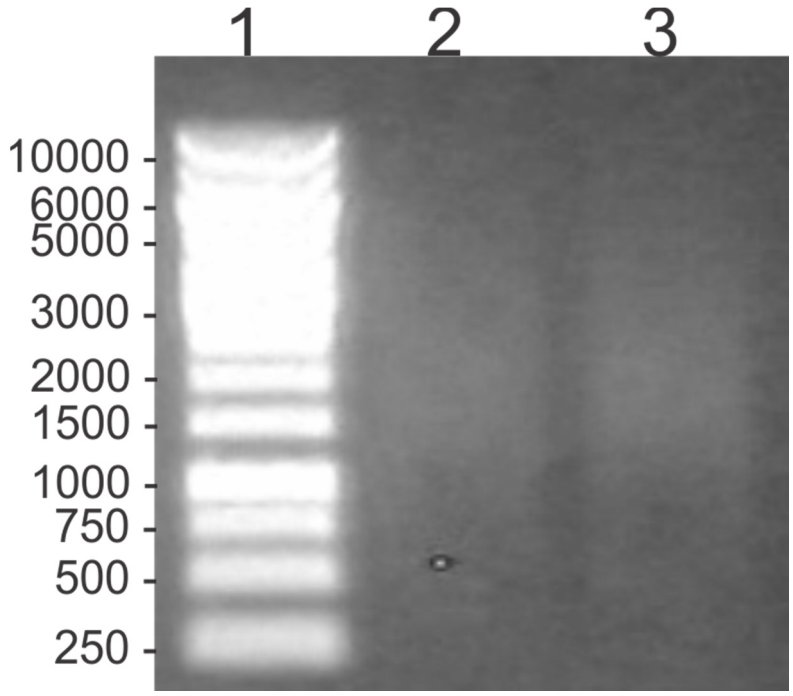


Figura 41. Primeira extração de DNA de *T. cruzi* em tecido fixado (placentas). Extração de DNA de *T. cruzi* de tecido placentário fixado em formol a 3,72% e conservado em álcool 80%. O material genético foi extraído diretamente do tecido com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega - USA) e visualizado sob luz ultra violeta após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Poço1: marcador de peso molecular; poço 2: DNA genômico extraído (amostra 1); Poço 3: DNA genômico extraído (amostra 2).

5.20.2 Segunda extração de DNA genômico de T.cruzi após tratamento de 24hs em tampão TE (Tris- EDTA) alcalino (pH 9,00 a 25°C)

A Figura mostra a extração de DNA genômico de *T. cruzi* em tecido fixado (placenta) em formol 3,72% após tratamento em tampão TE (EDTA 1mM, Tris-Cl 10 mM, pH 9,0). Nesta análise observamos uma maior quantidade de DNA fragmentado em relação à análise sem o tratamento. Além disso, observamos uma predominância de fragmentos entre 2000 e 2500 pb, como também, uma pequena quantidade de DNA genômico intacto (Figura 42, poço 2, seta). Este padrão, apesar da pequena quantidade, o tamanho é similar ao DNA de amostra fresca obtido pelo método tradicional (Figura 42, poço 3).

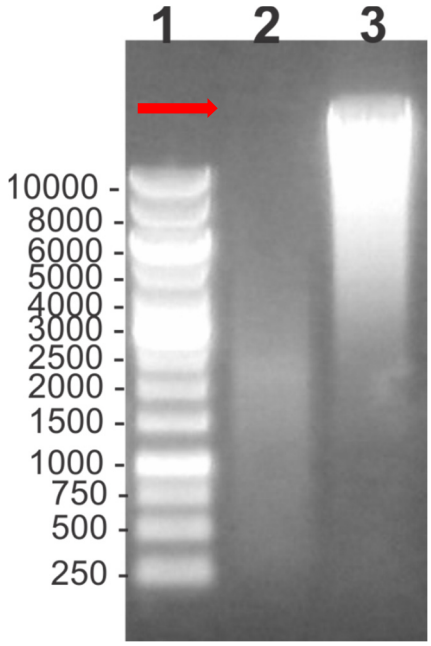


Figura 42. Extração de DNA de *T. cruzi em* tecido fixado (placentas) após tratamento com tampão TE 9. O DNA de *T. cruzi* foi extraído de tecido placentário, com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega - USA) após tratamento do tecido fixado, com o tampão TE 9 por 24h, 37°. O DNA foi visualizado sob luz ultra violeta após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). O material genético foi comparado com amostra extraída de tecido fresco, com o mesmo kit. Poço 1: marcador de peso molecular; poço 2: DNA extraído de tecido fixado; poço 3: DNA extraído de tecido fresco.

5.21 Amplificação da sequência S35/S36 de DNA de T. cruzi.

A Figura mostra a amplificação da sequencia S35/S36 de *T. cruzi* de placentas fixadas (Figura 43, poços 2 e 3) e de epimastigotas (figura, poços 4 e 5).Observamos nesta análise o mesmo padrão de bandas amplificadas; a correspondente aos primers S35/S36 de ~ 300 pb e o dímero de primers, menor que 200 pb.

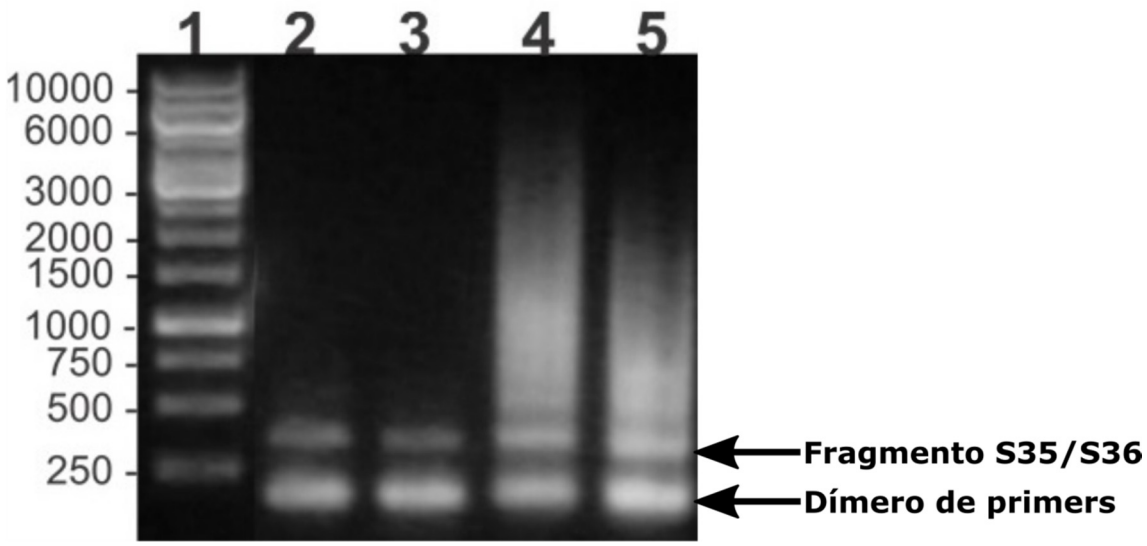


Figura 43. A sequencia S35/S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'- GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). A amostra foi comparada com o PCR sobre o DNA genômico de epimastigotas de *T. cruzi*, pelo mesmo processo e utilizando os mesmos primers. O DNA foi visualizado sob luz ultra violeta após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Poço 1: marcador de peso molecular; poços 2 e 3: PCR sobre o DNA extraído de tecido fixado (placenta); poço 4 e 5: PCR sobre o DNA extraído de epimastigotas. As setas indicam o fragmento S35/S36 (300 pb) e os dímeros de primers (< 200 pb) amplificados.

5.22 Detecção molecular de Trypanosoma cruzi em placentas

A Figura 44 mostra a amplificação da sequência S35/S36 de DNA genômico extraído de tecido fixado (placentas) das ratas Wistar prenhas controles sem tratamento (PC), prenhas controles tratadas (PCZ), prenhas infectadas (PI) e prenhas infectadas tratadas com zinco (PIZ). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). A seta indica o fragmento S35/S36 (300pb) amplificado nos diferentes poços.

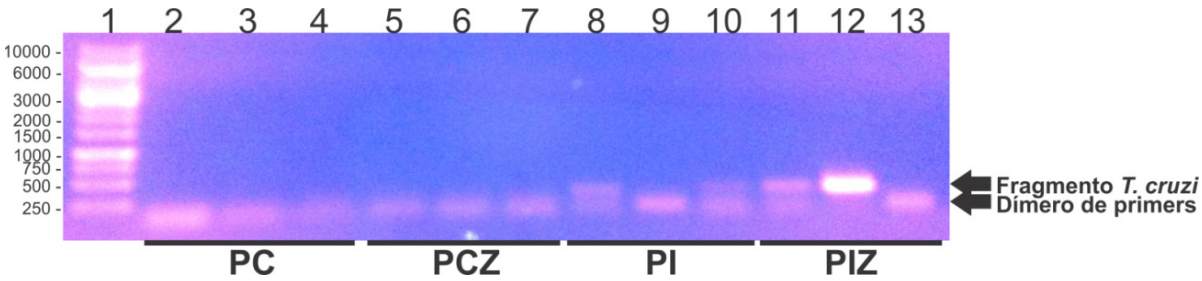


Figura 44. Amplificação da sequencia S35 S36 de DNA genômico de *T. cruzi* nas placentas. A sequência S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Poço 1: marcador de peso molecular; poços 2,3 e 4: PCR sobre o DNA extraído de tecido fixado (placenta) das prenhas controle (PC); poços 5, 6 e 7: PCR sobre o DNA extraído de tecido fixado (placenta) das prenhas controles tratadas (PCZ); poços 8, 9 e 10: sobre o DNA extraído de tecido fixado (placenta) prenhas infectadas (PI); poços 11, 12 e 13: sobre o DNA extraído de tecido fixado (placenta) das prenhas infectadas e tratadas com zinco (PIZ). As setas indicam o fragmento S35/S36 (300pb) e os dímeros de primers amplificados.

5.23 Detecção molecular de Trypanosoma cruzi nos tecidos fetais

Os primers S35 e S36 amplificaram fragmentos de aproximadamente 300 pb nas amostras fixadas de tecidos fetais provenientes de ratas prenhas infectadas e infectadas tratadas (Figura 45, poços 8 a 13). Os resultados observados na amplificação mostram uma maior carga parasitária no grupo infectado (PI - Figura 3, poços 8 a 10) em relação ao grupo infectado tratado (PIZ – Figura 45, poços 11 a 13).

A Figura 45 também mostra o aparecimento de dímeros de primers próximos à sequência amplificada, conforme indica a seta.

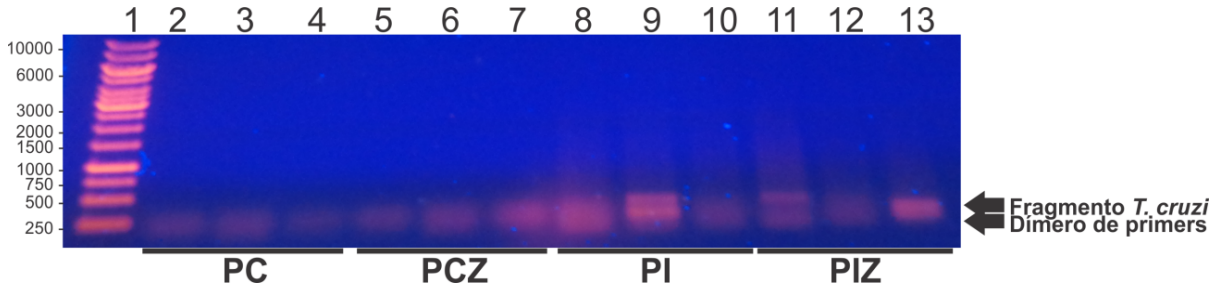


Figura 45. Amplificação da seqüência S35 S36 de DNA genômico de *T. cruzi* nos tecidos fetais. A sequencia S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). O DNA foi visualizado sob luz ultra violeta, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Poço 1: marcador de peso molecular; poços 2, 3 e 4: PCR sobre o DNA extraído de tecido fixado (fetos) prenhas controle (PC); poços 5, 6 e 7: PCR sobre o DNA extraído de tecido fixado (fetos) prenhas controle tratadas (PCZ); poços 8, 9 e 10: sobre o DNA extraído de tecido fixado (fetos) prenhas infectadas (PI); poços 11, 12 e 13 sobre o DNA extraído de tecido fixado (fetos) prenhas infectadas tratadas (PIZ). As setas indicam o fragmento S35/S36 (300pb) e os dímeros de primers amplificados.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Tendo em vista a importância do zinco para a manutenção da homeostasia do sistema imune, foi avaliado neste projeto, o efeito imunomodulador deste oligoelemento durante a infecção experimental por *T. cruzi* na prenhez de ratas Wistar. Para isto, buscamos compreender o perfil fenotípico das células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa durante o período gestacional em fêmeas prenhas infectadas suplementadas com sulfato de zinco.

A gestação é caracterizada por alterações genéticas e hormonais, a fim de assegurar a contínua provisão de nutrientes para o feto o que propicia o desenvolvimento e desfecho gestacional com sucesso para o binômio materno-fetal (MICHELON et al., 2006).

Este período, portanto, é definido por mudanças intensas no sistema imunológico para que condições imunológicas ideais sejam estabelecidas a fim de que o sucesso da gravidez seja garantido. Durante todo o período gestacional, o sistema imunológico materno é capaz de aceitar o desenvolvimento embrionário sem reagir contra o feto graças às mudanças do padrão de resposta imune (SISTI et al*.,* 2016).

A relação simbiótica que se estabelece na gravidez é garantida por meio da tolerância imunológica materna, definida como a capacidade da mãe para criar condições que facilitem a diferenciação e o desenvolvimento fetal (SCHNEIDER & AIRES 2008; SISTI et al., 2016).

Além das mudanças imunológicas, outras alterações fisiológicas e metabólicas alteram o organismo materno de forma holística, a exemplo da elevada demanda de nutrientes para garantir a intensa hematopoese, desenvolvimento do

útero, das glândulas mamárias e o próprio feto (WEETMAN, 1999; MOR & CARDENAS, 2010).

Os ajustes no metabolismo de nutrientes ocorrem desde as primeiras semanas de gestação, apesar da demanda fetal por nutrientes ocorrer principalmente durante a última metade da gestação; neste período ocorre mais de 90% do crescimento fetal e há aumento de cerca de 60% na taxa de metabolismo basal (KING, 2000).

Alterações de alguns nutrientes durante a gravidez podem representar um risco potencial à saúde da mãe e do feto. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO 2016), o consumo adequado de nutrientes é um dos fatores determinantes do crescimento fetal, com repercussão no peso e idade gestacional ao nascer. Estudos mostram, além disso, que condições de nutrição materna e intrauterina refletem diretamente no peso ao nascimento e na susceptibilidade ao aborto (SISTI et al., 2016).

O zinco é um micronutriente vital e está envolvido em todos os estágios do desenvolvimento embrionário e diferenciação tecidual, sinalização celular, produção de proteínas, e atua como chave da estrutura de muitas enzimas e estruturas celulares. O zinco ainda possui função central na ação catalítica de metaloenzimas, estabilização de fatores de transcrição, interação com moléculas em diversas vias metabólicas e, ainda, participa do transporte de substâncias (ASHWORTH & ANTIPATIS, 2001; FUKADA et al., 2011).

O zinco é um oligoelemento essencial para um vasto número de órgãos e sistemas; praticamente todos os aspectos da biologia humana envolve o zinco em alguma via metabólica (RINK, 2011; HAASE & RINK, 2014a).

Estudado por mais de 50 anos, o zinco é um fator primordial para o sistema imunológico (PRASAD, 1963; HAASE & RINK 2014b). Sabe-se, além disso, que a suplementação com zinco, em estado de deficiência, reduz a mortalidade em doenças infecciosas como pneumonia e diarreia (YAKOOB et al., 2011; HAASE & RINK 2014b).

Trabalhos recentes demonstram que este oligoelemento participa na modulação da resposta imune do hospedeiro e auxilia no controle de infecções causadas por bactérias, vírus e parasitas (PUERTOLLANO et al., 2011; CHASAPIS et al., 2012).

Estudo realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa mostrou que a administração de sulfato de zinco, na fase aguda da doença de Chagas experimental, reduziu a parasitemia, melhorou a resposta proliferativa de linfócitos além de diminuir significativamente o parasitismo placentário de ratas prenhas infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* (DA COSTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2017).

Apesar de todos os esforços e estudos que envolvem a doença de Chagas, o entendimento dessa patologia ainda requer maiores investigações. O progresso da doença e o sucesso do parasita no organismo dependem de variáveis como: a virulência da cepa, via de infecção, competência imunológica e idade do hospedeiro (ANDRADE et al., 2002; SAVINO et al., 2007; BARRETO DE ALBUQUERQUE et al., 2015).

Sabe-se que durante a fase aguda da doença de Chagas, a resposta imune é direcionada ao controle da parasitemia. Embora os mecanismos específicos que medeiam o controle de parasitas ainda não sejam plenamente esclarecidos, sabe-se que eles dependem da função imune inata como células NK, neutrófilos e macrófagos (ANDRADE et al., 2014).

Frente ao desafio por *T. cruzi*, o sistema imune desencadeia uma resposta inflamatória que determina a patogênese da doença. Estudos mostram que poucas horas após a infecção, antígenos de *T. cruzi* geram recrutamento de células NK antes da expansão de linfócitos T (BRENER & GAZZINELLI 1997). Nesse primeiro estágio da infecção, macrófagos induzem a produção de citocinas: a interleucina IL-12 atua sobre as células NK e induzem a produção IFN-γ. O interferon gama, por sua vez, aumenta a produção de IL-12, TNF-α e NO em macrófagos para a eliminação do parasita (CAMARGO et al., 1997; BASSO et al., 2013).

O óxido nítrico é o mediador solúvel mais importante produzido por células do sistema imunológico, sobretudo, macrófagos. Os macrófagos reconhecem microrganismos como fungos, protozoários e bactérias através de diferentes receptores, a exemplo do *Toll – like receptor,* que induzem as iNOS (óxido nítrico sintase), enzima presente em células apresentadoras de antígenos (PAVANELLI et al., 2010). Contudo, mesmo sendo uma molécula essencial para o extermínio do parasita, a presença de óxido nítrico em grandes concentrações provoca efeitos nocivos em tecidos hospedeiros e altera o equilíbrio TH1/TH2 (MICHAILOWSKY et al., 1998; SILVA et al., 2003; XIAO et al., 2008). Por essas razões, é essencial a formação de uma resposta imune eficaz, porém modulada.

No presente estudo, observamos que as fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* apresentaram diminuição da concentração de nitrito em culturas de células peritoneais estimuladas com LPS, o que claramente contribui para o sucesso do parasita, conforme dito anteriormente. Entretanto, o tratamento com sulfato de zinco mostra um aumento na produção desta molécula, que por sua vez, tem como objetivo a eliminação do parasita. O óxido nítrico tem ação citotóxica sobre *T. cruzi*, uma vez que afeta o fatores de crescimento do parasita, por exemplo, a nitrosilação

do grupo heme que reduz a disponibilidade de ferro. Além disso, trata-se do mais importante mediador da destruição intracelular de amastigotas (MICHAILOWSKY et al., 2001).

Os macrófagos são primordiais na manutenção de um ambiente imunológico adequado para o crescimento fetal normal. Essas células se mantêm na região da decídua como a maior população de células apresentadoras de antígenos (APCs), cuja função é proporcionarem o equilíbrio entre tolerância imunológica e a ativação da resposta pró-inflamatória, especialmente no tocante à ativação de células (BARTMANN et al., 2014; MORROT et al., 2016).

Além da produção de óxido nítrico, os macrófagos são considerados os maiores responsáveis pela resposta imune inata frente a *T. cruzi* também pela expressão de moléculas MHC classe II (GUERMONPREZ et al., 2002).

Nosso trabalho mostra que animais infectados por *T. cruzi* e submetidos à terapia com zinco apresentaram um aumento no percentual de macrófagos que expressam RT1B (MHC II) quando comparado aos animais infectados, sem tratamento. Nossa hipótese mais uma vez está pautada no papel imunomodulador do zinco, que pode ter contribuído para manter o equilíbrio entre o combate eficaz do parasita, mas, ao mesmo tempo, proteger a gravidez.

As moléculas MHC de classe II são heterodímeros expressos sobre a superfície das células apresentadoras de antígenos e constituem o elo entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo que a deficiência dessas moléculas pode acarretar imunodeficência grave, enquanto a expressão exacerbada pode causar doenças autoimunes (BOTTAZZO et al., 1983; VILLARD et al., 1997; COMALADA et al., 2003). Assim, a regulação da expressão de moléculas MHC classe II é um ponto crítico no controle e manutenção da resposta imune (XAUS et al., 2000).

Para que ocorra a completa ativação dos linfócitos T, as células apresentadoras de antígenos contam com sinais co-estimuladores que acontecem concomitantemente ao reconhecimento de antígenos (WATTS & AMIGORENA, 2001).

As vias de co-estimulação CD80 / CD86-CD28 de células T dentro da família B7-CD28 são cruciais, pois representa o segundo sinal para a regulação e ativação de linfócitos T (WANG & CHEN 2004; MAGALHÃES et al., 2015). Descoberta na década de 80, a molécula CD28 é expressa constitutivamente na superfície de 80% de células $TCD4^+$ humanas, 50% na superfície de células $TCD8^+$ humanas e 100% de ambas as células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ em murinos (ARUFO & SEED, 1987; GROSS et al. 1990; PORCIELO & TUOSTO, 2016; BRZOSTEK et al., 2016). Sabe-se que a molécula CD28 é requerida também para a expansão de células T reguladoras (LIU et al., 2006). Outros pesquisadores já descreveram que camundongos $CD28^{-/-}$ apresentavam acentuada redução no número de células Treg $CD4^+CD25^+$ (SALOMON et al., 2000; TANG et al., 2003).

Foi possível observar em nossos estudos que as fêmeas infectadas e suplementadas com sulfato de zinco não apresentaram alteração significativa no percentual de linfócitos $TCD4^+CD28^+$. Por outro lado, o tratamento das fêmeas infectadas com zinco, resultou em redução no percentual de células $TCD8^+CD28^+$ quando comparado aos animais infectados e não tratados. Esse evento pode estar associado à concomitante diminuição de células T reguladoras nos animais suplementados com sulfato de zinco.

Na infecção por *Trypanosoma cruzi,* estudos com o bloqueio simultâneo das moléculas CD80 e CD86, por meio de anticorpos monoclonais específicos, revelaram

a exacerbação da infecção e aumento da parasitemia de animais infectados (MIYAHIRA et al., 2003).

Em nossos experimentos também avaliamos os percentuais de células apresentadoras de antígenos (CD11b/c$^+$), presentes no lavado peritoneal dos animais, e dentre estas células (CD11 b/c$^+$), foi então analisada a expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86. Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que nas amostras de lavado peritoneal provenientes dos animais infectados e tratados com zinco, o percentual de APCs e a expressão de moléculas coestimulatórias foi maior, quando comparados com o grupo infectado sem tratamento.

Uma das descobertas mais interessantes na bioquímica do zinco é seu papel como um componente da resposta imunológica, sendo um deles o papel sinalizador de ativação de células T (YAMASAKI et al., 2007; FUKADA et al., 2011; YU et al. 2011; HAASE E RINK, 2014a; HAASE E RINK, 2014b) Diante disso, podemos inferir que nosso resultado na análise de CD11b/c$^+$ ligadas a CD80/86 pode estar relacionado à suplementação de zinco e uma possível otimização da resposta imunológica em células apresentadoras de antígenos.

No intuito de proteger o organismo da agressão parasitária, o sistema imunológico gera linfócitos TCD4$^+$ e TCD8$^+$ que migram para os linfonodos e órgãos linfoides para gerarem a resposta imune adequada (BASSO, 2013). Contudo, o desvio do padrão de resposta TH1 materno para a resposta TH2 é fundamental para o sucesso da gravidez, o que inclui a diminuição da resposta proliferativa (WEGMANN et al., 1993; WEETMAN 1999; LA ROCCA et al., 2014). Essa mudança é necessária porque células T maternas reconhecem aloantigenos paternos, porém, a gravidez promove um estado de tolerância transiente de células T específica para os antígenos paternos (TAFURI et al., 1995). Embora a organização anatômica da interface

materno-fetal seja arquitetada para minimizar a reação imunológica materna contra o embrião, outros mecanismos adicionais são gerados para proteger o feto da rejeição imunológica materna, o que inclui a inibição da proliferação das células T. Esse mecanismo é garantido por meio da privação de triptofano, via 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima expressa por trofoblastos e macrófagos que catabiliza o triptofano em kinurenina, um subproduto tóxico para células T e células dendríticas (MUNN et al., 1998; PICCINNI et al., 1998; GROHMANN et al., 2002; LA ROCCA et al., 2014).

Em concordância com a literatura, os dados encontrados neste estudo mostraram a diminuição da resposta celular proliferativa nas prenhas infectadas tratadas com zinco. Além disso, observamos que essa diminuição acontece no grupo controle tratado com zinco, o que mais uma vez sugere o papel imunoprotetor desse oligoelemento durante a prenhez.

Neste contexto, componentes clássicos da imunidade inata, tais como células dendríticas, macrófagos e células NK são cruciais para o estabelecimento da imunidade protetora durante os eventos iniciais da infecção por *T. cruzi.*

As células NK também representam um grupo de linfócitos do sistema imune inato, com grande potencial citolítico, detentores de diversas funções fisiológicas (SUN et al, 2009). As células NKT, por sua vez, constituem um subconjunto de células NK, que expressam em sua superfície o marcador celular CD161 e são fundamentais na resposta imune inata.

No útero, tais linfócitos desempenham papel fundamental na formação vascular e os chamados uNK (células uterinas diferenciadas em células NK) são considerados vigilantes do sistema imunológico materno e estão diretamente envolvidos na regulação e formação da angiogênese e do sistema circulatório (ZHANG et al, 2010). Trata-se da única linhagem de célula transiente no tecido uterino,

uma vez que o seu percentual cai significativamente na segunda metade da gestação tanto em humanos, mamíferos ou roedores. Contudo, o aumento expressivo no percentual da população de células NK está relacionado às complicações durante a gravidez tais como pré-eclâmpsia e hipertensão (CHAKRABORTY, 2011; SOARES et.al., 2014).

Nossos dados demonstraram que a suplementação com sulfato de zinco durante o período gestacional proporciona uma diminuição nos percentuais de células NKT quando comparadas ao grupo não tratado, o que sugere o papel regulador do zinco na resposta imunológica materna.

O processo de morte celular programada, ou apoptose, é caracterizado por alterações morfológicas, bioquímicas e é considerado um componente vital de vários processos, incluindo a renovação celular, desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico (ELMORE 2007).

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento como um mecanismo homeostático para manter populações de células nos tecidos. Entretanto, o processo de apoptose também acontece como um mecanismo de defesa celular, como ocorre em reações imunológicas ou mediante danos causados por patógenos ou agentes externos nocivos (NORBURY e HICKSON, 2001). Existe uma vasta quantidade de estímulos mediante condições fisiopatológicas que induzem o processo de apoptose, contudo, nem todas as células respondem a esses estímulos. A irradiação ou drogas anticancerígenas desencadeiam a morte celular por apoptose por meio do dano no DNA pela via dependente de p-53 (ELMORE, 2007).

Na doença de Chagas experimental crônica, a morte celular por apoptose ocorre em células esplênicas, linfócitos T e B, além de células cardíacas (LOPES et al., 1995; ZHANG et al., 1999; DE MEIS et al., 2006). Essas células, como já

mencionado anteriormente, tem importante papel no controle da doença e disseminação do parasita.

Alguns estudos evidenciam que a quelação de zinco induz o processo de apoptose celular, ao passo que a adição de zinco, em meio de cultura, diminui a morte celular mesmo após a exposição destas células à agentes pró-apotóticos como a irradiação gama (ZALEWSKI et al., 1993).

Na análise basal, nossos resultados mostraram uma redução na porcentagem de células esplênicas em estágio inicial de apoptose no grupo infectado tratado com zinco. Este resultado sugere que o zinco exerce influência na redução da apoptose celular esplênica, em ratas prenhas, independente de estarem infectadas ou não. Entretanto, quando essas células são cultivadas por 5 dias em estufa a 5% CO_2 e atmosfera úmida, observamos um aumento da apoptose, sobretudo quando estimuladas com antígeno de *T. cruzi*. O estímulo com o antígeno parasitário provavelmente mimetiza a re-exposição à doença. Nesse aspecto, o zinco contribuiu como regulador na redução da expansão linfocitária mediante o estímulo infeccioso.

Dentre tantos recursos celulares de grande importância para o controle da infecção por *Trypanosoma cruzi* está o papel de outras subpopulações de linfócitos. As células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ são geradas nos linfonodos e migram para os sítios de infecção para conter a disseminação parasitária (BASSO 2013). Ambas subpopulações de linfócitos produzem IFN-γ, que por sua vez, estimulam macrófagos a produzirem NO como já mencionado anteriormente.

A resposta imunológica é perfeitamente integrada uma vez que, células dendríticas, linfócitos B e macrófagos ativados induzem a expansão clonal de células T, e assim, o sistema se retroalimenta por meio da produção de diferentes citocinas

produzidas por linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$, que polarizam as resposta do tipo *T helper* (CARDILLO et al., 2007; MACHADO et al., 2012; BASSO 2013).

O papel de células $TCD4^+$ na doença de Chagas está relacionado tanto à atividade efetora (T_{eff}) quanto à atividade reguladora (T_{reg}), sendo essa última também discutida em nosso trabalho.

Sabe-se que função efetora de células $TCD4^+$ é devida à sua atividade citolítica, via produção de perforinas, que contribuem para a eliminação do parasita (KEESEN et al., 2012). A relevância de células $TCD4^+$ no controle da infecção por *T. cruzi* já é descrita em humanos e em roedores (PADILLA et al., 2007). Essa importância se deve a estudos que comprovam a presença de infiltrado de células T em tecido miocárdico em pacientes chagásicos, o que demonstra a tentativa de controle parasitário por essas células nos tecidos infectados, sobretudo no coração (FUENMAYOR et al. 2005; GROSSMAN et al., 2004).

Linfócitos citotóxicos $TCD8^+$ (CTL) possuem grânulos de serina-proteases (granzima A e perforinas) que atuam na redução da carga parasitária nos sítios inflamatórios. Essas células são recrutadas para os sítios de infecção mediante o estímulo de IFN-γ (CHOWDHURY & LIEBERMAN 2008; DOTIWALA et al., 2016).

As primeiras evidências do papel crucial das células $TCD8^+$ na resposta imune frente a *T. cruzi* foram descritas em estudos com depleção dessas células utilizando anticorpos anti-CD8. Posteriormente, outro estudo foi realizado com espécies *knockout* para TCD8 ($TCD8^{-/-}$). Em ambos os casos, a ausência de linfócitos TCD8 nos camundongos gerou a morte desses animais no início da fase aguda da infecção e ocasionou o aumento da carga parasitária na fase crônica (TARLETON, 1994 ROTTENBERG et al., 1995). Além disso, a ausência de linfócitos TCD8 também foi associada à severidade da doença na fase crônica aliada à diminuição de IFN-γ

(MARTIN & TARLETON, 2004; PADILLA et al., 2009). No entanto, apesar de todo o aparato celular envolvido no controle da infecção, o parasita consegue sobreviver no hospedeiro por longos períodos. Mesmo com um sistema imune competente, a geração de células $TCD8^+$ não é suficiente para a eliminação parasitária. Embora a resposta linfocitária seja considerada apropriada para conter uma infecção potencialmente letal, por outro lado, autores a consideram como responsável pelo dano tecidual em longo prazo (COMBS et al., 2005; PADILLA et al., 2009; TARLETON, 2015a). Devido á característica inerente aos CTL de produzir granzimas, pacientes em fase crônica da doença de Chagas apresentaram infiltrado celular em tecido miocárdico provocado por células TCD8. Assim, a exacerbação da resposta mediada por esses linfócitos contribui para um quadro inflamatório (TARLETON, 2015a; TARLETON, 2015b).

Nosso estudo mostra que a suplementação com sulfato de zinco em fêmeas tratadas com zinco apresentaram significante redução no percentual de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ quando comparado aos animais infectados e não tratados. Atribuímos esse fenômeno ao papel modulador do zinco e sua influência no padrão de resposta do tipo TH1/TH2. A diminuição do padrão de resposta TH1 pode também estar associada ao concomitante aumento de citocinas reguladoras, como pudemos observar nas concentrações de TGF-β.

Além da atuação de diferentes compartimentos celulares, inúmeras moléculas estão envolvidas no processo de adesão celular. A LFA-1 (CD11a/CD18) é uma integrina pertencente à superfamília das moléculas de adesão, associada a cadeias α e β, cuja função e diversidade heterodimérica permite sua integração frente a diversos estímulos (GIBLIN et al., 2006). Expressa em todos os subconjuntos de células imunológicas, LFA-1 foi a primeira a ser identificada entre várias moléculas de

adesão que desempenham um papel fundamental na formação do conjugado entre células T citotóxicas e seus alvos (DAVIGNON et al., 1981). Contudo, a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, miocárdicas e linfóides foi observada em lesões teciduais sendo associada à patogênese da doença de Chagas (REIS et al., 1993).

No presente estudo, o tratamento com sulfato de zinco reduziu expressão de CD11a (LFA-1, CD11a/CD18) em linfócitos $TCD4^+$ nas fêmeas infectadas e tratadas com zinco, reforçando nossas observações anteriores que sugerem o papel protetor desse oligoelemento durante a doença de Chagas. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na expressão de CD11a em linfócitos $TCD8^+$ de animais dos grupos infectados submetidos à terapia de zinco em relação aos animais infectados e não tratados.

No tocante à resposta imune adaptativa, considera-se o papel dos linfócitos B como produtores de anticorpos. Contudo, sabe-se que durante a infecção chagásica existe um processo de apoptose espontânea de células B que independe da influência de outras células. Esse evento foi demonstrado por Zuñiga e colaboradores (2000), que analisaram a expressão de Fas, uma proteína transmembrana indutora da apoptose, expressa em maior quantidade em linfócitos B provenientes de camundongos infectados com *T. cruzi.* A expressão dessa proteína explica a diminuição da proliferação de linfócitos B em animais infectados com *T. cruzi.*

Ao contrário do papel benéfico de anticorpos protetores contra agentes externos, durante a gravidez, a presença de auto-anticorpos exerce efeito negativo no curso da gestação. Nesse contexto, pode-se considerar, por exemplo, anticorpos antifosfolípides (APL) associado a diversas complicações obstétricas, tais como a

morte fetal intrauterina, abortos espontâneos, trombose venosa profunda, pré-eclampsia (HARRIS, 1990; AYRES & SULAK 1991; MUZZIO et al., 2013).

Em nosso trabalho, a caracterização das subpopulações de células B durante a infecção por *T. cruzi* foi realizada através da marcação da molécula (CD45RA), sendo observada uma redução na porcentagem de linfócitos B nas fêmeas infectadas, submetidos à terapia com zinco, o que sugere mais uma vez o papel regulador e imunoprotetor deste oligoelemento durante a gestação.

A regulação do sistema imune durante a gravidez constitui um dos aspectos mais importantes da imunologia da gestação. As células T reguladoras (Treg) são descritas como uma única população de células $TCD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$, cuja capacidade é controlar a resposta imune excessiva ou mal direcionada a patógenos ou autoantígenos (SAKAGUCHI et al., 1995; COLLS et al., 2007; SAKAGUCHI et al., 2008).

Uma das funções essenciais do sistema imunológico é distinguir antígenos próprios de antígenos estranhos. Essa característica do sistema imune garante o estado de tolerância à auto antígenos, sem que o organismo os destrua (BURNET, 1949). O estado de tolerância previne desordens inflamatórias ocasionadas pela exacerbação da resposta imune.

Assim, manutenção do estado de tolerância é devida, em parte, ao papel das células T regulatórias, que correspondem de 5 a 15% dos linfócitos $TCD4^+$ periféricos em camundongos e humanos (SAKAGUSHI 2006; SAKAGUSHI 2008).

Estudos mostram que a depleção de células T reguladoras por anticorpos monoclonais anti-CD25, após o acasalamento, prejudicam a implantação do feto em camundongos geneticamente diferentes. Contudo, o mesmo não acontece em camundongos geneticamente idênticos, o que sugere o papel das células T

reguladoras na indução da tolerância imunológica materna (LEBER et al., 2010; LEBER et al., 2011; ZENCLUSSEN et al., 2005; RUOCCO et al., 2014).

Os mecanismos específicos associados ao estabelecimento às manifestações clínicas da doença de Chagas são extremamente complexos. Entender por que apenas uma porcentagem de indivíduos infectados desenvolve manifestações da doença e por que as formas clínicas são altamente distintas é de grande importância para a melhor compreensão desta patologia. Estudos demonstram que as diferentes formas clínicas estão associadas à relação hospedeiro-parasita envolvendo diretamente a resposta imunológica (GAZZINELLI et al., 1990; REIS et al., 1993; GOMES et al., 2003; COSTA et al., 2009). De fato, sabe-se que o desenvolvimento da doença está associado principalmente à capacidade imune do hospedeiro de controlar o parasitismo persistente. Contudo, ao mesmo tempo, a exacerbação da resposta antinflamatória contribui para os danos colaterais da doença, que causa a morbidade da doença de Chagas (DE ARAUJO et al., 2011).

Conforme ocorreu na maioria dos parâmetros analisados, o zinco mostra uma tendência de levar a resposta imunológica a níveis próximos daqueles observados nos grupos controle. Essa mesma tendência foi observada nos percentuais de células T reguladoras, uma vez que os resultados obtidos no grupo infectado e tratado com sulfato de zinco são próximos aqueles encontrados no grupo controle tratado com este oligoelemento.

Sabe-se que durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* dois subtipos celulares ligados à persistência da resposta imunológica de memória são evidentes (MARTIN & TARLETON 2005; BUSTAMANTE et al., 2008; TARLETON et al., 2013). Uma delas, capaz de produzir de citocinas e baixa capacidade proliferativa (T_{EM}

CD62L^{low}) e outra subpopulação linfocitária com grande capacidade de proliferação contudo pouco eficaz diante da produção de citocinas (T_{CM} CD62L^{high}).

Estudos realizados frente à infecção viral mostraram que 95% da ativação de linfócito T não é antígeno específica e, além disso, trabalhos cujos objetivos eram a detecção do tetrâmero de MHC de classe I, provaram que em torno de 50% da ativação de linfócito TCD8 está direcionada a um único epítopo e presente apenas durante o pico viral. Para entender melhor a especificidade da resposta imunológica de memória frente a *T. cruzi,* estudos revelam que há células TCD8 responsáveis pela identificação e detecção de epítopos do parasito (PADILLA et al., 2009).

Trabalhos realizados com *Leishmania major* ainda mostram que o perfil imunológico via células T é bastante heterogêneo. A análise do sobrenadante de cultura de células provenientes de camundongos, estimuladas com antígeno de *L. major (*SLA – soluble leishmanial antigen*),* apresentou um aumento da produção de IFN-γ relacionada ao perfil de células TCD4^{+} CD62L^{low} (ZAPH et al., 2004). Semelhante ao estudo anterior, nossos revelam uma possível associação entre a diminuição do perfil fenotípico de CD62L^{low} e baixos níveis de concentração de IFN-γ durante no 48° dia da infecção chagásica experimental no grupo das fêmeas tratadas com zinco.

A disseminação de *T. cruzi* depende da resposta imune inata e adquirida desencadeadas no início da infecção porque determinam a sobrevivência do hospedeiro. Como mencionado anteriormente, essa resposta envolve macrófagos, células NK, linfócitos T, linfócitos B, além da produção de citocinas pró-inflamatórias Th-1 tais como o IFN-γ, TNF-α, e IL-12 (KRAUTZ et al., 2000; PADILLA et al., 2007; TARLETON, 2007; PADILLA et al., 2009; MACHADO et al., 2012).

A produção de citocinas funciona como um elo entre o sistema imune inato e adquirido, uma vez que induz a expansão clonal de células T auxiliares Th1 $CD4^+$, bem como células $TCD8^+$ e células B.

A resistência do hospedeiro à infecção depende, em primeiro lugar, da resposta do sistema imune inato como primeira barreira celular e de produção de citocinas. Macrófagos, células NK e células dendríticas produzem IL-12, IFN-γ e TNF-α na tentativa de controlar a replicação parasitária (MONTEIRO et al., 2007; GAZZINELLI et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2010; MORROT et al., 2016).

Estudos em idosos mostraram a participação do zinco na maturação de células T via produção de timulina, um hormônio presente no timo, responsável pela maturação de células do sistema imune. A deficiência de zinco não só diminuiu a produção de timulina, mas também, a produção de IL-2, INF-γ e IL-12, sendo essa última essencial para a atividade fagocítica de macrófagos frente às infecções (PRASAD et al., 2007; PRASAD, 2014). Em concordância com a literatura, nossas análises mostraram um aumento nas concentrações de IL-12 em prenhas infectadas e tratadas com sulfato de zinco. Nossa análise sugere, portanto, uma possível interação direta entre a suplementação de sulfato de zinco e a alteração da resposta imune celular via citocinas.

Linfócitos T helper tipo 1 (Th1) produzem IL-2, IL-6, IFN-γ e TNF-α que são caracteristicamente indutoras da imunidade celular mas estão relacionadas ao aborto (CLARK et al., 1998). A interleucina 2 induz proliferação de linfócitos o que a torna essencial na formação de uma resposta imunológica eficaz. Porém, durante a infecção por *T. cruzi,* estudos mostram que existe uma diminuição na expressão do receptor de IL-2 provocada pelo próprio parasita (SZTEIN & KIERSZENBAUM, 1992; MACHADO et.al., 2012). Essa habilidade do protozoário é, certamente, mais uma

estratégia de evasão do sistema imune cuja eficácia garante sua permanência no organismo.

Na anemia falciforme, uma situação de imunossupressão como a gravidez, observa-se uma diminuição no número de linfócitos T periféricos, redução da atividade de células NK e redução da produção de IL-2. Porém, a suplementação alimentar com zinco levou a restauração de todos esses parâmetros a níveis próximos dos normais (Zinc metabolism. Current aspects in health and disease, 1977; TAPAZOGLOU et al., 1985; PRASAD & SHANKAR 1998; PRASAD, 2009; PRASAD et al., 2012).

Nossos resultados mostraram um aumento significativo nas concentrações de IL-2 no soro das prenhas infectadas tratadas com sulfato de zinco (PIZ). Esse fenômeno pode ser atribuído novamente à capacidade do zinco de melhorar a resposta imunológica na imunossupressão, conforme relata a literatura.

Sabe-se que durante a gravidez ocorre uma mudança no perfil de citocinas, com um predomínio de uma resposta imune Th2, sendo esta alteração necessária para a manutenção do microambiente gestacional e a tolerância imunológica aos tecidos feto-placentários (LA ROCCA et al., 2014).

Linfócitos T helper tipo 2 (Th2), produzem IL-3, IL-4 e IL-10, que atuam em linfócitos B para produção de anticorpos, bloqueiam a atividade citotóxica, e inibem NK deciduais com potencial anti-inflamatório (MICHELON et al., 2006). Neste contexto, a produção de IL-10 por células T é primordial para o sucesso e manutenção da gravidez (LA ROCCA et. al., 2014). Pesquisadores que investigam a interface materno-fetal apontam a prevalência de citocinas do padrão TH2 sobre o padrão TH1 em gestações bem sucedidas (CLARK et al., 1998)..

Segundo SAITO e colaboradores (2010), camundongos *knockout* para IL-10 apresentaram uma maior susceptibilidade ao aborto causado por reação inflamatória.

Além disso, estudos avaliam o papel imunossupressor sinérgico entre IL-10 e TGF-β, sendo essa última capaz de induzir a diferenciação de células T reguladoras, cujo papel é indispensável para manutenção do feto (CHEN et al., 2003).

Além do perfeito equilíbrio entre os padrões Th1/ Th2, estudos mostram outra possibilidade de integração imunológica na gravidez: o padrão Th17. Linfócitos do tipo $TCD4^+$ produzem IL-17, citocina que também atua no período gestacional e induz a inflamação relacionada ao aborto (WANG et al., 2010; NAKASHIMA et al. 2010; ROCCA et al., 2014). Níveis de IL-17 estão aumentados nas doenças autoimunes e infecções devido à suas propriedades pró-inflamatórias que induzem fibroblastos, células endoteliais, macrófagos além da produção de mediadores inflamatórios, como GM-CSF, IL-1, IL-6, TNF-α, iNOS, metaloproteinases e quimiocinas que orquestram o recrutamento de neutrófilos (NAKAE et. al., 2003; ZELANTE et.al., 2007). Contudo, na doença de Chagas, a produção de IL-17 regula a expressão de fatores de transcrição (T-bet, RORγt, e STAT-3), quimiocinas e citocinas relacionadas à patogênese da doença (DA MATTA GUEDES et.al., 2010).

Diante desses achados, nossa análise no perfil de citocinas reguladoras (IL-10, IL-17, TGF-β) revela um aumento significativo nas concentrações de IL-17 no grupo infectado e tratado com zinco quando comparado ao grupo sem tratamento. Tendo em vista a influência do zinco no sistema imunológico como já mencionado, nossa hipótese é que, sob a terapia com sulfato de zinco, o sistema imunológico responde de maneira sincronizada que tende sempre ao padrão de modulação da resposta imune. Esse fenômeno também foi observado nas análises intracelulares de linfócitos $TCD4^+$/$TCD8^+$ produtores de IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α.

Nossos resultados em células $TCD4^+$ demonstraram que os níveis de TNF-α estavam reduzidos nas fêmeas prenhas infectadas e suplementadas com zinco

quando comparados aos animais infectados e não tratados. Mesmo não havendo alterações estatisticamente significativas na expressão de IL4 e IL-10 em linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ quando comparado aos grupos infectados e não tratados, observa-se nesses grupos uma tendência que sugere a imunomodulação proporcionada pelo zinco.

Além do papel das citocinas, consideramos também as dosagens de MCP-1/ CCL2, quimiocina secretada por uma vasta quantidade de células em processos inflamatórios para o recrutamento de monócitos aos tecidos lesados (KUZIEL et. al., 1997; SERBINA et.al., 2008). Estudos com *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis* mostraram que a ausência de MCP-1/ CCL2 reduz a capacidade de controle de infecções e aumenta a susceptipilidade a esses patógenos (ROBBEN et. al. 2005; BENEVIDES et. al., 2008). Do mesmo modo, sabe-se que esta quimiocina é produzida em grandes quantidades no coração de camundongos infectados por *T. cruzi* para aumentar destruição de parasitária. Estudos com camundongos *knockout* ($CCL2^{-/-}$) desenvolveram parasitemia superiores aos camundongos *wild type* (WT) além de apresentarem maior taxa de mortalidade (PAIVA et. al., 2009).

Em nosso modelo experimental, níveis acentuados de MCP-1 em células $TCD4^+$ foram observados nas fêmeas prenhas submetidas à terapia com zinco No entanto, não foram observadas alterações significativas na expressão de MCP-1 em linfócitos $TCD8^+$ nos animais infectados e tratados com zinco, quando comparado aos animais sem tratamento.

Durante a gravidez, a permanência do concepto até o fim da gestação depende de uma rede imunoreguladora, acionada por diversos mecanismos celulares, hormonais e imunológicos, que atuam de forma a garantir a tolerância materno-fetal (WEETMAN, 1999; GUERIN et. al., 2009; LA ROCCA et.al., 2014).

Dados de nossos estudos de fase aguda mostraram a influência do tratamento com L- arginina em fêmeas prenhas infectadas por *T. cruzi*. Uma das mudanças imunológicas observadas mediante a suplementação foi a diminuição significativa de níveis de corticosterona nos animais suplementados quando comparados ao grupo sem tratamento (DA COSTA et.al., 2014). De maneira semelhante, a suplementação com zinco durante a fase aguda da doença de Chagas experimental também resultou na diminuição dos níveis de corticosterona nos animais tratados (Dados não publicados). Entretanto, nossos dados no presente estudo mostram que, no 48° dia da infecção, os níveis de corticosterona no sangue materno não se altera de maneira significativa.

A detecção de *T. cruzi* por PCR é um método corrente para determinação da carga parasitária em diversos órgãos (Moser *et al.*, 1989). Entretanto não há dados sobre a detecção do parasita em tecidos placentário ou fetal fixados. Além disso, no trabalho anterior do nosso grupo (DA COSTA et al., 2013) a detecção de *T. cruzi* por histologia foi verificada apenas em tecido placentário de ratas; nos tecidos fetais não foi possível detectar ninhos de amastigotas, indicativo da infecção transplacentária.

Em humanos e camundongos (BADRA et al., 2008) a transmissão transplacentária da doença de Chagas já foi descrita. Entretanto, estudando a infecção aguda de ratas prenhes, pela cepa Y de *T. cruzi,* a infecção fetal não se confirmou no estudo histológico (DA COSTA et al., 2013). No presente estudo, O DNA foi extraído dos tecidos placentário e fetal, indicando que esse método é viável para detecção de DNA genômico de *T. cruzi* em tecido fixado. Utilizando os primers S35/S36, foi possível obter padrões diferentes entre as amostras de animais infectados e não infectados. Isto reforça que a detecção de *T. cruzi* de amostras fixadas é possível, e é um método compatível com uso de kit de extração de DNA.

Nossos resultados auxiliarão na detecção desse parasita em amostras estocadas em diversos laboratórios e museus, principalmente aqueles anteriores a popularização de métodos de detecção molecular.

Os fragmentos S35/S36 foram observados apenas nas amostras de animais infectados, excluindo a possibilidade de contaminação. O tratamento com zinco aparentemente não diminuiu a carga parasitária, o que é previsto pois o metal não apresenta capacidade tripanocida.

Desta forma, o estudo ora realizado comprova a influência do zinco sobre os diferentes aspectos da resposta imune do hospedeiro no 48° dia da doença de Chagas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Este estudo revela a possível influência direta da suplementação de zinco sobre a resposta imune inata e adaptativa em ratas Wistar prenhas na doença de Chagas experimental. Os dados aqui encontrados mostram que os animais suplementados com sulfato de zinco apresentam um perfil de resposta imunológica moduladora nos diversos perfis estudados.

Nossas análises acrescentam ao campo dos estudos em doença de Chagas experimental, a possibilidade de investigações mais aprofundadas para que melhor se compreenda o papel de oligoelementos na resposta imunológica frente ao desafio por *T. cruzi.*

Referências Bibliográficas

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHWORTH, CHERYL J., LUIZA M. TOMA, AND MORAG G. HUNTER. “Nutritional Effects on Oocyte and Embryo Development in Mammals: Implications for Reproductive Efficiency and Environmental Sustainability.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological* ***Sciences.,*** v. 364, p.3351–3361. 2009

ALIJOTAS-REIG, J.; LLURBA, E.; GRIS, J. M. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. ***Placenta,*** v.35, p.241-8, 2014.

ANDRADE, L. O. et al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. ***Exp Parasitol*****,** v.100,p.269-75, 2002.

ANDRADE, M. C. et al. Vitamins in the treatment of chronic Chagas disease: adjuvant antiparasitary or antioxidant therapy?. ***Rev Soc Bras Med Trop*****,** v.47, p.670-1,2014.

ARNOLD, D. **Warm climates and Western medicine: the emergence of tropical medicine, 1500-1900**. Rodopi, 1996.

ARUFFO, A.; SEED, B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. ***Proc Natl Acad Sci U S A*****,** v.84,p.8573-7, 1987.

AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. ***Proc Natl Acad Sci U S A,*** v.101, p.2034-9, 2004.

AYRES, M. A.; SULAK, P. J. Pregnancy complicated by antiphospholipid antibodies. ***South Med J,*** v.84, p.266-9, 1991.

BADRA, E. S. et al. Histopathological changes in the placentas and fetuses of mice infected with *Trypanosoma cruz*i isolated from the Myotis nigricans nigricans bat. ***J Comp Pathol*,** v.139, p.108-12, 2008.

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J. et al. Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? ***PLoS Negl Trop Dis.*** v.9, p.e0003849, 2015.

BARTMANN, C. et al. Quantification of the predominant immune cell populations in decidua throughout human pregnancy. ***Am J Reprod Immunol.,*** v.71, p.109-19, 2014.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. ***World J Exp Med.,*** v.3, p.1-10, 2013.

BENEVIDES, L. et al. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. ***Am J Pathol.*,** v.173, p.741-51, 2008.

BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. ***Clinical microbiology reviews.,*** v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011. ISSN 0893-8512.

BILLINGTON, W. D. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. ***J Reprod Immunol****.,* v.60, p.1-11. 2003.

BOTTAZZO, G. F. et al. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. ***Lancet,*** v. 2, p.1115-9, 1983.

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.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. ***Int Arch Allergy Immunol*.,** v. 114, p.103-10, 1997.

BRYAN NS, GRISHAM MB. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. ***Free Radic. Biol. Med.,*** v. 43, p.645-657, 2007.

BRZOSTEK, J.; GASCOIGNE, N. R.; RYBAKIN, V. Cell Type-Specific Regulation of Immunological Synapse Dynamics by B7 Ligand Recognition. ***Front Immunol,*** v.7, p.24, 2016.

BRIEFEL, R. R., BIALOSTOSKY, K., KENNEDY-STEPHENSON, J., MCDOWELL, M. A., ERVIN, R. B., & WRIGHT, J. D. Zinc intake of the US population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey,. ***J. Nutr****.,* v.130, p. 1988–1994 (Suppl) 1367S-1373S, 2000.

BURNET, F. M. **The Production of Antibodies. By F.M. Burnet and Frank Fenner . Second edition**. Melbourne: Macmillan & Co., 1949.

BUSTAMANTE, J. M.; BIXBY, L. M.; TARLETON, R. L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. ***Nat Med*,** v.14, p.542-50, 2008.

CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. ***J Immunol*,** v.159, p.6131-9, 1997.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. ***Immunology*,** v. 122, p.584-595, 2007.

CARINI, A. Uber schizogonien bei trypanosomen. ***Archiv fur Protistkunde*,** v. 24, p.80-83, 1912.

CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: an update. ***Mem Inst Oswaldo Cruz.,*** v.110, p.363-8, 2015.

CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. ***PLoS Negl Trop Dis*,** v.5, p.1250, 2011.

CARLIER Y, TRUYENS C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. ***Acta Trop.*** v.151, p.103-15, 2015.

CARVALHEIRO, J. D. R. et al. **Clássicos em Doença de Chagas: histórias e perspectivas**. Fiocruz, 2009.

CAULFIELD L.E. et al., Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. ***Am J Clin Nutr.*,** v.68(2 Suppl): 499S-508S., 1998.

CHAGAS, C. *Trypanosoma minasense*. **Nota preliminar. *Brazil-Medico*,** v.22, p.471, 1908.

CHAGAS, C. Neue Trypanosomen. ***Archiv für Schiffs-und Tropenhygiene,*** v. 13, p.120, 1909a.

CHAGAS, C.. Nova espécie mórbida do homem produzida por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*). Nota prévia. ***Brasil Médico*,** v.230, p.161, 1909b.

CHAGAS, C.. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. ***Mem Inst Oswaldo Cruz*,** v.1, p.159-218, 1909c.

CHAGAS, C. Trabalho do Instituto de Manguinhos sobre uma nova trypanosomiase humana, pelo dr. Carlos Chagas, assistente do Instituto. ***Ann Acad Med.,*** v.75, p.188-190, 1909d.

CHAGAS FILHO, C. Carlos Chagas: meu pai. **Rio de Janeiro, Casa de Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.[Links]**, 1993.

CHAKRABORTY, D. et al. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. ***Proc Natl Acad.*,** v.108, p.16295-300, 2011.

CHAOUAT, G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? ***Semin Immunopathol.,*** v. 29, p. 95-113, 2007.

CHASAPIS, C. T. et al. Zinc and human health: an update. ***Arch Toxicol.*** v. 86, p.521-34, 2012.

CHEN, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. ***J Exp Med,*** v.198, p.1875-86, 2003.

CHOWDHURY, D.; LIEBERMAN, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. ***Annu Rev Immunol*,** v.26, p.389-420, 2008.

CLARK, D. A. et al. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. ***J Immunol.,*** v.160, p.545-9, 1998.

COIMBRA, JR. C. E. A. Human Settlements, Demographic Pattern, and Epidemiology in Lowland Amazonia: The Case of Chagas's Disease. ***American Anthropologist,*** v.90, p.82-97, 1988.

COMALADA, M. et al. Decorin reverses the repressive effect of autocrine-produced TGF-beta on mouse macrophage activation. ***J Immunol*,** v.170, p. 4450-6, 2003.

COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. ***J Biol Chem,*** v.280, p. 24085-94, 2005.

COOLS, N. et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. ***J Leukoc Biol.,*** v.82, p1365-74, 2007

COSTA, G. C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. ***J Infect Dis.,*** v.199, p.451-4, 2009.

COURA, J. R. Síntese histórica e evoluçäo dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. In: (Ed.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**:. p.469-86. Fiocruz, 1997.

COUSINS R. J., LIUZZI J. P., LICHTEN L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals***. J. Biol. Chem***.v 281,p.24085-24089 . 2006.

DA COSTA, C. M. et al. Does L-arginine availability during the early pregnancy alters the immune response of *Trypanosoma cruzi* infected and pregnant Wistar rats? ***Exp Parasitol,*** v.142, p.59-66, 2014.

DA COSTA, C. M et al., Zinc and pregnancy: markedchanges on the immune response following zinc therapy for pregnant femaleschallenged with *Trypanosoma cruzi*. ***Clin. Nutr***., v.32, p.592-598. 2013.

DA COSTA, C. M et al., Chagas disease control and role of zinc supplementation in pregnancy. ***Matters***. (*inpress),* 2017

DA MATTA GUEDES, P. M. et al. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. ***PLoS Negl Trop Dis.,*** v.4,p.e604, 2010.

DAVIGNON, D. et al. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. ***Proc Natl Acad Sci.,*** v.78, p.4535-9, 1981.

DE ARAUJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. ***PLoS Negl Trop Dis.,*** v.5, p.e992, 2011.

DE MEIS, J. et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. ***Microbes Infect.,*** v.8, p.221-31, 2006.

DIAS, J. C. P. COURA, J. R. Clinica e terapeutica da doença de Chagas, Epidemiologia, Ed. Fiocruz. 1997.

DOTIWALA, F. et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. ***Nat Med,*** v.22, p.210-6, 2016.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. ***Toxicol Pathol.,*** v. 35, p.495-516, 2007.

FERREIRA L.G. Erário mineral dividido em doze tratados. Dedicado, e oferecido à puríssima, e sereníssima virgem Nossa Senhora da Conceiçaõ. Lisbon: Miguel Rodrigues; 1735.

FILTJENS, J. et al. The Ly49E Receptor Inhibits the Immune Control of Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. ***Front Immunol.*,** v.7, p.472, 2016.

FUENMAYOR, C. et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. ***Acta Cardiol.,*** v.60, p.33-7, 2005.

FUKADA, T. et al. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. ***J Biol Inorg Chem.*,** v.16, p.1123-34, 2011.

GAZZINELLI, R. T. et al. Two modes of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas' disease: correlations with clinical forms of infection. ***Res Immunol*,** v.141, p.757-70, 1990.

GIBLIN, P. A.; LEMIEUX, R. M. LFA-1 as a key regulator of immune function: approaches toward the development of LFA-1-based therapeutics. ***Curr Pharm Des.,*** v.12, p.2771-95, 2006.

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. ***Infect Immun.,*** v.71, p.1185-93, 2003.

GROHMANN, U. et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. ***Nat Immunol.,*** v. 3, p.1097-101, 2002.

GROSS, J. A.; ST JOHN, T.; ALLISON, J. P. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. ***J Immunol,*** v.144, p.3201-10, 1990.

GROSSMAN, W. J. et al. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. ***Blood,*** v.104, p.2840-8, 2004.

GUERIN, L. R.; PRINS, J. R.; ROBERTSON, S. A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? ***Hum Reprod Update.,*** v.15, p.517-35, 2009.

GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. ***Annu Rev Immunol.,*** v.20, p.621-67, 2002

GUERRA, F. American trypanosomiasis. An historical and a human lesson. ***J Trop Med Hyg.,*** v.72, p.83-104, 1970.

GUHL, F. et al., Isolation of Trypanosoma cruzi DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. ***Am J Phys Anthropol.,*** v.108,p. 401-7, 1999.

GUHL, F. et al., *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. ***Lancet,*** v. 349, p.1370, 1997.

HAASE, H.; RINK, L., Multiple impacts of zinc on immune function. ***Metallomics,*** v.6, p.1175-80, 2014a.

HAASE, H.; RINK, L., Zinc signals and immune function. ***Biofactors,*** v.40, p.27-40, 2014b.

HARRIS, E. N. Maternal autoantibodies and pregnancy--I: The antiphospholipid antibody syndrome. ***Baillieres Clin Rheumatol.,*** v.4, p.53-68, 1990.

HOTEZ, P. J. et al. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. ***PLoS Negl Trop Dis***., v.7, p.e2300, 2013.

HRUBY Z, BECK KF. Cytotoxic effect of autocrine and macrophage-derived nitric oxide on cultured rat mesangial cells. ***Clin Exp Immunol***. v.107, p.76-82, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON NUTRITIONAL STATUS DURING PREGNANCY AND, L. In: (Ed.). ***Nutrition During Pregnancy: Part I Weight Gain: Part II Nutrient Supplements***. National Academies Press (US) by the National Academy of Sciences., 1990.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. ***Expert Rev Mol Med.,*** v. 12, p.e29, 2010.

KEEN, C. L. et al. The plausibility of micronutrient deficiencies being a significant contributing factor to the occurrence of pregnancy complications. ***J Nutr.,*** v.133, (Suppl 2), p.1597S-1605S, 2003.

KEESEN, T. S. et al. Characterization of CD4(+) cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanossoma cruzi* infection. ***Scand J Immunol.,*** v.76, p.311-9, 2012.

KIERSZENBAUM, F.; SZTEIN, M. B. *Trypanosoma cruzi* suppresses the expression of the p75 chain of interleukin-2 receptors on the surface of activated helper and cytotoxic human lymphocytes. ***Immunology.,*** v.75, p.546-9, 1992.

KING, J. C. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. ***Am J Clin Nutr.,*** v.71, (Suppl), p.1218S-25S, 2000.

KING, J. C. Zinc: an essential but elusive nutrient. ***Am J Clin Nutr.,*** v.94, p.679S-84S, 2011.

KRAUTZ, G. M.; KISSINGER, J. C.; KRETTLI, A. U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. ***Parasitol Today.,*** v.16, p.31-4, 2000.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. ***História, Ciências, Saúde-Manguinhos,*** v.16, p.13-34, 2009.

KUZIEL, W. A. et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. ***Proc Natl Acad Sci.,***v.94, p.12053-8, 1997.

LANGGAARD T. J. H. Diccionario de medicina domestica e popular. Rio de Janeiro: Eduardo & Henrique Laemmert; 1865.

LA ROCCA, C. et al. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. ***Immunol Lett.,*** v.162, p.41-8, 2014.

LEBER, A.; TELES, A.; ZENCLUSSEN, A. C. Regulatory T cells and their role in pregnancy. ***Am J Reprod Immunol.,*** v.63, p.445-59, 2010.

LEBER, A. et al. Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses. ***Methods Mol Biol.,*** v.677, p.397-417, 2011.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. ***J Exp Med****.,* v.203, p.1701-11, 2006.

LOPES, M. F. et al. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. ***J Immunol.,*** v.154, p.744-52, 1995.

LOPES, M. F.; DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: blockade of costimulatory T-cell. ***Infect Immun.,*** v. 62, p.1484-8, 1994.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. ***Semin Immunopathol.,*** v. 34, p.753-70, 2012.

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

MAGALHAES, L. M. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi.* ***PLoS Negl Trop Dis.,*** v.9, p.e0003816, 2015.

MAGALHÃES, O. D. Un poco da la vida de Carlos Chagas. ***Revta Circulo med.*** v.63, p.9-15, 1944.

MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. ***J Immunol.,***v.174, p.1594-601, 2005.

MEDAWAR P. B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. ***Symp Soc Exp Biol***, v.7, p.320-338, 1953.

MENEGHELLI, U. G. Miguel Dias Pimenta (1661-1715) and the history of chagasic megaesophagus and megacolon. ***Arq Gastroenterol.,*** v.33, p.115-21, 1996.

MICHAILOWSKY, V. et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi.* ***Antimicrob Agents Chemother.,*** v.42, p.2549-56, 1998.

MICHAILOWSKY, V. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. ***Am J Pathol.,*** v.159, p.1723-33, 2001.

MICHELON, T. et al, Imunologia da gestação. ***Revista da AMRIGS***, v.50, p. 145-151, 2006.

MILES, M. A. The discovery of Chagas disease: progress and prejudice. ***Infect Dis Clin North Am.,*** v.18, p.247-60, 2004.

MIYAHIRA, Y. et al. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. ***Infect Immun*,** v.71, p.3131-7, 2003.

MONTEIRO, A. C. et al. Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. ***PLoS Pathog*.,** v.3, p.e185, 2007.

MONTGOMERY, S. P. et al. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. ***Am J Trop Med Hyg*.,** v. 90, p.814-8, 2014.

MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. ***Am J Reprod Immunol*,** v.63, p.425-33, 2010.

MOREL, C. M. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. ***Mem Inst Oswaldo Cruz*.,** v.94 (Suppl 1) p.3-16, 1999.

MORROT, A. et al. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? ***Front Microbiol.,*** v. 7, p.704, 2016.

MOSER, D. R., et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. ***J Clin Microbiol.,*** v. 27, p. 1477-82, 1989.

MUNN, D. H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. ***Science.,*** v.281, p.1191-3, 1998.

MURILLO, J. et al. Congenital Chagas' disease transmission in the United States: Diagnosis in adulthood. ***IDCases.,*** v.5, p.72-5, 2016.

MUZZIO, D.; ZENCLUSSEN, A. C.; JENSEN, F. The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. ***Am J Reprod Immunol.,*** v.69, p.408-12, 2013.

NAKAE, J. et al. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. ***Dev Cell,*** v.4, p.119-29, 2003.

NAKASHIMA, A. et al. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. ***Am J Reprod Immunol.,*** v.64, p.4-11, 2010.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. ***Annu Rev Pharmacol Toxicol.,*** v.41, p. 367-401, 2001.

OZORIO DE ALMEIDA, M. Ensaios, críticas e perfis. ***Rio de Janeiro: F. Briguiet e Cia.***, 1938.

PADILLA, A. et al. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. ***Infect Immun.,*** v.75, p.231-5, 2007.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. ***Curr Opin Immunol.,*** v.21, p.385-90, 2009.

PAIVA, C. N. et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. ***J Leukoc Biol.,*** v.86, p.1239-46, 2009.

PAVANELLI, W. R. et al. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. ***Braz J Infect Dis.,*** v.4, p.606-612, 2010.

PETRY, NICOLAI et al. The Effect of Low Dose Iron and Zinc Intake on Child Micronutrient Status and Development during the First 1000 Days of Life: A Systematic Review and Meta-Analysis. ***Nutrients*.,** v.8. p.773, 2016.

PICCINNI, M. P. et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. ***Nat Med.,*** v.4, p.1020-4, 1998.

PIMENTA, M. D.; MANESCAL, M**.** Noticias do que he o Achaque do Bicho: diffiniçam do seu crestame [n]to, subimento corrupção, sinaes, e cura até, o quinto grao, ou intensaõ delle, suas differenças, & co [m] plicaçe [n] s, com que se ajunta. 1707.

PORCIELLO, N.; TUOSTO, L. CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling. ***Cytokine Growth Factor Rev.,*** v.28, p.11-9, 2016.

PRABHUDAS, M. et al. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. ***Nat Immunol***., v.16,. p.328-34. 2015.

PRASAD, A. S. Zinc: an overview. ***Nutrition.,*** v.11,(Suppl 1), p. 93-9, 1995.

PRASAD, A. S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. ***Curr Opin Clin Nutr Metab Care.,*** v.12, p.646-52, 2009.

PRASAD,.A.S. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. ***J Trace Elem Med Biol.,*** v.26, p.66-9, 2012

PRASAD, A.S. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. ***Front Nutr.,*** v.1, p.14, 2014.

PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. ***Am J Clin Nutr.,*** v.85, p.837-44, 2007.

PRASAD A. S. et al. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypognadism. ***J Lab Clin Med.,*** v.61, p.537-49, 1963.

PUERTOLLANO, M. A. et al. Dietary antioxidants: immunity and host defense. ***Curr Top Med Chem.,*** v.11, p.1752-66, 2011.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. ***Immunol Today.,*** v.18, p.478-82, 1997.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. ***Am J Trop Med Hyg.,*** v. 48, p.637-44, 1993.

REZENDE, J. M. Forma digestiva da moléstia de Chagas. **Rev Goiana Med,** v. 5, p. 193-227, 1959.

L. RINK, Zinc in Human Health, IOS Press, Amsterdam, 2011.

ROBBEN, P. M. et al. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. ***J Exp Me.,*** v.201, p.1761-9, 2005.

ROTHHAMMER, F. et al. Chagas' disease in pre-Columbian South America. ***Am J Phys Anthropo.,*** v.68, p.495-8, 1985

ROTTENBERG, M. E. et al. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. ***Immunol Lett.,*** v.45, p. 53-60, 1995.

RUOCCO, M. G. et al. Regulatory T-cells in pregnancy: historical perspective, state of the art, and burning questions. ***Front Immunol.,*** v.5, p.389, 2014.

SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. ***Am J Reprod Immunol.,*** v.63, p.601-10, 2010.

SAITO S. et al. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? ***J Assist Reprod Genet.,*** v.24, p.379-86, 2007.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of

self-tolerance causes various autoimmune diseases. ***J Immunol.,*** v.155, p.1151-64, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. ***Cell.,*** v.133, p.775-87, 2008.

SAKAGUCHI, S., Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+} natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. ***Immunol. Rev.,*** v.212, p.27, 2006.

SALOMON, B. et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. ***Immunity.,*** v.12, p.431-40, 2000.

SAMSTEIN, R. M. et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. ***Cell.,*** v.151, p.153-66, 2012.

SARGENT, I. L.; BORZYCHOWSKI, A. M.; REDMAN, C. W. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. ***Trends Immunol.,*** v.27, p.399-404, 2006.

SAVINO, W. et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi.* ***Cytokine Growth Factor Rev.,*** v.18, p.107-24, 2007.

SCHNEIDER, D. S.; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. ***Nat Rev Immunol.,*** v.8, p.889-95, 2008.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. ***Annu Rev Immuno.,*** v. 26, p.421-52, 2008.

SHANKAR, A. H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. ***Am J Clin Nutr.,*** v.68, (Suppl) p.447S-463S, 1998.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. ***Front Biosci.,*** v.8, p.314-25, 2003.

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.

SISTI, G.; KANNINEN, T. T.; WITKIN, S. S. Maternal immunity and pregnancy outcome: focus on preconception and autophagy. ***Genes Immun.,*** v.17, p.1-7, 2016.

STEVERDING, D. The history of African trypanosomiasis. **Parasit Vectors,** v. 1, n. 1, p. 3, Feb 12 2008. ISSN 1756-3305.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. ***Parasit Vectors.,*** v.7, p.317. 2014.

STURM, N.R., Sensitive detection and schizodeme classification of Trypanosoma cruzi cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. ***Mol Biochem Parasitol.,*** v.33, p.205-214.1989.

SUN, J. C.; BEILKE, J. N.; LANIER, L. L. Adaptive immune features of natural killer cells. ***Nature,*** v.457, p.557-61, 2009.

TAFURI, A. et al. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. ***Science.,*** v.270, p.630-3, 1995.

TANG, Q. et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. ***J Immunol.,*** v.171, p.3348-52, 2003.

TAPAZOGLOU, E. et al. Decreased natural killer cell activity in patients with zinc deficiency with sickle cell disease. ***J Lab Clin Med.,*** v.105, p.19-22, 1985

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. ***Curr Opin Immunol.,*** v.19, p.430-4, 2007.

TARLETON. CD8(+) T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. ***Semin Immunopathol.,*** v.37, p.233-8, 2015a.

TARLETON. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. ***Semin Immunopathol.,*** v.37, p.233-8, 2015b.

TARLETON, R. L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. ***Infect Immun.,*** v.62, p.1820-9, 1994.

TERENZI, F. et al. 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.

TERRIN, G. et al. Zinc in Early Life: A Key Element in the Fetus and Preterm Neonate. **Nutrients.,** v.7, p.10427-46, 2015.

TROWSDALE, J.; BETZ, A. G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. ***Nat Immunol.,*** v.7, p.241-6, 2006.

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

VILLARD, J.; MACH, B.; REITH, W. MHC class II deficiency: definition of a new complementation group. ***Immunobiology.,*** v.198, p.264-72, 1997.

WANG, S.; CHEN, L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. ***Cell Mol Immunol.,*** v.1, p.37-42, 2004.

WANG, Y. et al. Amino-terminal fragment of C-type natriuretic peptide precursor and C-type. ***J Cardiovasc Pharmacol.,*** v.55, p.62-6, 2010.

WATTS, C.; AMIGORENA, S. Phagocytosis and antigen presentation. ***Semin Immunol.,*** v.13, p.373-9, 2001.

WEETMAN, A. P. The immunology of pregnancy. ***Thyroid.,*** v.9, p.643-6, 1999.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? ***Immunol Today.,*** v. 14, p.353-6, 1993.

WORBOYS, M. Manson, Ross and colonial medical policy: tropical medicine in London and Liverpool, 1899-1914. Disease, medicine and empire: Perspectives on western medicine and the experience of European expansion, p. 21-37, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assembly Resolution. Chagas disease: control and elimination, ***WHA63.20*** , French, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) World Health Organ Fact Sheet. 340. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). **Weekly Epidemiological Record**, v.85, p.334-336, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Invest to Overcome Global Impact of Neglected Tropical Disease. Geneva. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Chagas disease (American trypanosomiasis) http://www.who.int/chagas/disease/en/, 2016.

XAUS, J. et al. The expression of MHC class II genes in macrophages is cell cycle dependent. **J Immunol,** v. 165, n. 11, p.6364-71, 2000.

XIAO, B. G. et al. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. ***Mol Immunol.,*** v. 45, p.1191-6, 2008.

YAKOOB, M. Y. et al. Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. ***BMC Public Health.,*** v.11, (Suppl 3), p.S23, 2011.

YAMASAKI, S. et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. ***J Cell Biol.,*** v.177, p.637-45, 2007.

YU, M. et al. Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx. ***J Exp Med.,*** v.208, p.775-85, 2011.

ZALEWSKI, P. D.; FORBES, I. J.; BETTS, W. H. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). ***Biochem J.,*** v.296, p.403-8,1993.

ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to Leishmania major in the absence of persistent parasites. ***Nat Med.,*** v.10, p.1104-10, 2004.

ZELANTE, T. et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. ***Eur J Immunol.,*** v.37, p.2695-706, 2007

ZHANG, J. et al. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. ***J Mol Cell Cardiol.,*** v.31, p.581-96, 1999.

ZHANG, JIANHONG ET AL. “Natural Killer Cell-Triggered Vascular Transformation: Maternal Care before Birth?” *Cellular and Molecular* ***Immunology*.,** v. 8, p.1–11. 2011.

Zinc metabolism. Current aspects in health and disease. Alan R. Liss. New York, N.Y.:, Inc., 1977. xi + 365pp.

ZLOTKIN, S. H.; CHERIAN, M. G. Hepatic metallothionein as a source of zinc and cysteine during the first year of life. ***Pediatr Res.,*** v.24, p.326-9, 1988.

ZUNIGA, E. et al. Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. ***Clin Exp Immunol.*,** v.119, p.507-15, 2000.

Anexo