UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

O efeito do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de
Trypanosoma cruzi

Murilo Rodrigues Barbosa de Freitas

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

O efeito do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de
Trypanosoma cruzi

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado(a): Murilo Rodrigues
Barbosa de Freitas

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Amélia
Carraro Abrahão

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 26/09/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

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.

Freitas, Murilo Rodrigues Barbosa

O efeito do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, Ribeirão Preto, 2014.

91 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

1 Gestação; 2 Selênio; 3 Doença de Chagas; 4 Placenta

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Murilo Rodrigues Barbosa de Freitas

Título do trabalho: O efeito do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Amélia
Carraro Abrahão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha família, à sabedoria de
meu Pai, à crença de minha mãe, ao
apoio de minha irmã, ao amor de
minha noiva, e a Deus, que me
abençoou com todos eles.

Agradecimentos

Agradecimentos

Em uma dissertação nunca se trabalha sozinho, tudo é resultado de um trabalho conjunto de pessoas e neste caso não foi diferente. Como diria John Donne, o homem não é uma ilha, e como diz um páraquedista amigo meu: “juntos somos fortes, sozinhos não somos nada”, e é com grande alegria e satisfação que exponho abaixo todas as pessoas importantes para a conclusão desta tese.

*“Aos meus pais **Célia Regina Rodrigues de Freitas** e **José Roberto de Freitas**, que proporcionaram tudo que um filho pode ter, sem nunca faltar carinho, amor, consideração e respeito. Obrigado por repassarem a mim e à minha irmã a maior herança de todas.... o caráter”.*

*“À **Aline Peres Nunes**, minha noiva, amiga, companheira, minha paixão, que me acompanhou por todo este período de dificuldade, correria, enxaqueca, tendinite, labirintite, insônia, hipertensão, mas sempre me apoiou, acreditou em mim e nunca me deixou desanimar. Meu eterno obrigado e meu eterno amor minha branca! Te amo!”*

*“À Professora Doutora **Ana Amélia Carraro Abrahão**, que me deu a oportunidade de continuidade nos estudos, de poder sonhar com um futuro melhor, de concretizar um objetivo de vida, de um dia ser professor, muito obrigado pela atenção, dedicação e pelo exemplo de vida”.*

*“À **Cassia Mariana Bronzon**, colega de mestrado e de orientadora, que sempre me ajudou nas dúvidas e questionamentos, por todo o apoio e sabedoria repassados sempre com muita alegria e consideração”.*

*“Ao Professor Doutor **José Clóvis do Prado Júnior**, por todo o conhecimento transmitido, pelo auxílio na escrituração da tese e paper, mas principalmente pelo bom humor e alegria constantes”.*

*“À **Mirian Paula Alonso Toldo**, obrigado pelos ensinamentos, pela alegria, por todos os momentos de ajuda, auxílio e aconselhamentos, sua experiência é o que nos ajuda e nos inspira”.*

*“Aos experimentos ensinados, repassados e auxiliados pelas colegas **Fabricia Helena Santello, Marina Del Vecchio Filipin, Vânia Brazão**”.*

*“Aos meus colegas de laboratório: **Luiz Gustavo Rodrigues, Gisele Bulhões Portapilla, Júnior Furini, Christian Collins Kuehn, Mariana Rosa, Janaína Monteiro.***

*“Ao Professor Doutor **Miguel Angel Sala**, pelo auxílio na confecção e análise dos cortes histológicos e revisão de toda a parte estatística do trabalho”.*

*“Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, **Cristiana Gonçalves, Georgius Luiz de Oliveira e Inara Fernanda Gallo**, que contribuem e são essenciais com o desenvolvimento científico-tecnológico no laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP”.*

*“Aos meus antigos colegas de trabalho **Danielle e Ismael**, sem eles não seria possível a realização do meu mestrado”.*

*“Ao Professor Doutor **Sérgio de Albuquerque**, pelo apoio e conhecimento repassados”.*

*“À minha irmã **Paula**, meu espelho de empenho e dedicação”.*

*“À **Vania Cláudia de Albuquerque**, pelo auxílio no resumo em espanhol”.*

“Às ratas Wistar, que sua morte possa contribuir com a diminuição da morbimortalidade de muitas pessoas chagásicas no futuro”.

*“À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (**FCFRP-USP**), em especial ao programa de Biociências Aplicadas à Farmácia”.*

“Ao laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP”.

*“À Universidade Federal de Alfenas, (**Unifal**) que me iniciou na carreira acadêmica”.*

“À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para realização da pesquisa (Processo nº 2009/11029-4)”.

"Esse é só o começo do fim da
nossa vida. Deixa chegar o sonho,
prepara uma avenida que agente vai
passar..."

LOS HERMANOS

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas e siglas	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> , Doença de Chagas e Infecção Congênita	1
1.2. Invasão do Parasita	5
1.3. Resposta Imune na Doença de Chagas	8
1.4. Óxido Nítrico (NO)	10
1.5. Tratamento	12
1.6. Selênio	13
1.7. Selênio e a Doença de Chagas	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MATERIAL e MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Grupos Experimentais	20
3.3. Dias de Experimento	21
3.4. Parasitas	21
3.5. Infecção	21
3.6. Administração de selênio	21
3.7. Eutanásia dos Animais	21
3.8. Coleta de sangue	22
3.9. Parasitemia	22
3.10. Técnica Histológica	22
3.11. Contagem de Parasitas Teciduais	22
3.12. Pesagem dos animais e órgãos	23

3.13. Taxa de mortalidade dos animais.....	23
3.14. Preparação da suspensão de células peritoneais e quantificação de óxido nítrico.....	23
3.15. Ensaio imunológico.....	24
3.16. Análise das populações celulares por citometria de fluxo.....	25
3.17. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Parasitemia.....	26
4.2. Resultados Morfológicos.....	27
4.2.1. Número Total de Fetos/Placentas nos Diferentes Grupos Experimentais.....	27
4.2.2. Peso do Coração das Fêmeas Prenhas Controles e Infectadas.....	28
4.2.3. Peso da Placenta.....	29
4.2.4. Diâmetro da Placenta.....	30
4.2.5. Peso dos Fetos.....	31
4.2.6. Comprimento dos Fetos.....	32
4.3. Macrófagos.....	33
4.4. Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	34
4.5. Resultados da Citometria - Análise das Populações Celulares.....	36
4.5.1. Células NK.....	35
4.5.2. Células T CD3 ⁺ CD4 ⁺	36
4.5.3. Células T CD3 ⁺ CD8 ⁺	37
4.5.4. Linfócitos B (CD45 ⁺).....	38
4.6. Dosagem de Citocinas.....	39
4.6.1. IL-2.....	39
4.6.2. TNF- α	40
4.6.3. IFN- γ	41
4.6.4. IL- 4 e IL-10.....	42
4.6.5. TGF- β	43
4.7. Resultados Histológicos.....	44
4.7.1. Parasitismo Placentário.....	44
4.7.2. Histologia da Placenta.....	45
4.7.2.1. Grupo Controle.....	45

4.7.2.2. Grupos Infectados.....	46
4.7.2.2.1. Grupo Infectado sem Tratamento (PI).....	47
4.7.2.2.2. Grupo Infectado Tratado com Selênio (PIS).....	48
4.7.3. Parasitismo Cardíaco.....	52
4.7.4. Histologia do Coração.....	53
4.7.4.1. Grupos Controles	53
4.7.4.2. Grupos Infectados.....	54
4.7.4.2.1. Grupo Infectado sem Tratamento (PI).....	55
4.7.4.2.2. Grupo Infectado Tratado com Selênio (PIS).....	56
4.7.5. Histologia dos fetos.....	57
 5. DISCUSSÃO.....	 59
 6. CONCLUSÃO.....	 68
 7. REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS.....	 69

RESUMO

RESUMO

FREITAS, M. R. B. **O efeito do selênio em ratas prenhas Wistar infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*** 2014, p 91. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O selênio (Se) é um micronutriente importante na dieta de mamíferos e tem sido descrito com importante papel na função imune. É constituinte de mais de 25 selenoproteínas na forma do aminoácido selenocisteína, sendo este elemento crítico na manutenção do sistema de defesa antioxidante. Uma dieta complementar com Se pode ser benéfica no tratamento de doenças correlacionadas com altos níveis de estresse oxidativo, como a doença de Chagas, enfermidade negligenciada causada por *Trypanosoma cruzi*. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Se em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*. O tratamento com Se desencadeou aumento no peso e comprimento fetal, bem como no diâmetro e peso placentário. Também foi observada diminuição da parasitemia. Não ocorreram alterações significativas nas concentrações de NO e no número de ninhos de amastigotas no coração. A avaliação histológica das placentas mostrou elevado número de ninhos de amastigotas nos animais do grupo infectado e tratado. A redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias e de populações de células T desencadeou uma resposta voltada ao padrão Th-2, característico da gestação, fato que provavelmente contribuiu no aumento do parasitismo placentário encontrado nos animais tratados com Se. Assim, é possível que a administração de Se, durante a prenhez, poderia alterar a resposta imune placentária local, favorecendo a instalação do parasita. Mais estudos são necessários para avaliar a interação entre o Se e a doença de Chagas durante a prenhez.

Palavras-chave: Selênio; Doença de Chagas; Gestação; Placenta; Rato.

ABSTRACT

ABSTRACT

FREITAS, M. R. B. **The selenium effects in pregnant rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi***. 2014, p 91. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The selenium (Se) is an essential micronutrient in the diet of mammals and has an important role in the immune function. A range of 25 selenoproteins has Se in its structure and most of them in the form of amino acid selenocysteine, being this element involved in the maintenance of the antioxidant defense. Diet with Se is beneficial in the treatment of diseases correlated with high levels of oxidative stress, like Chagas' disease, a neglected illness caused by *Trypanosoma cruzi*. The objective of this study was to evaluate the effects of selenium in the immune response of pregnant Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. Se treatment triggered enhanced fetal weight and length and placental diameter and weight. It was observed decreased parasitemia. No significant alterations in NO concentrations and amastigote nests in heart were observed. The histological evaluation of placenta displayed an enhanced number of amastigote nests in infected and Se treated animals. The reduction of pro-inflammatory cytokines and T cell populations triggered a Th-2 immune response, which is the hallmark of the gestation period. This fact probably led to the raise in parasite nests in placenta of infected and Se treated animals. So it is possible that the Se supplementation during pregnancy could impair the local placental immune response. Further studies are needed to assess the interaction between selenium and the acute Chagas' disease during pregnancy.

Keywords: Selenium; Chagas' disease; Pregnancy; Placenta; Rat.

RESUMEN

RESUMEN

FREITAS, M. R. B. **El efecto del selênio em ratas Wistar embarazadas infectadas com la cepa Y de *Trypanosoma cruzi***, 2014, p 91. Tesis (Master). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

El selenio (Se) es un micronutriente importante en la dieta de los mamíferos y ha sido descrito como importante rollo en la función inmune. Es constituido de más de 25 selenoproteínas bajo la forma del aminoácido selenocisteína, siendo este elemento crítico en la manutención del sistema de defensa antioxidante. Una dieta complementaria con el Se puede ser benéfica en el tratamiento de enfermedades correlacionadas con altos niveles de estrese oxidativo, como la enfermedad de Chagas, una enfermedad negligenciada causada por el *Trypanosoma cruzi*. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos del selenio en ratas Wistar preñes infectadas por la cepa Y del *T. cruzi*. El tratamiento con selenio desencadenó aumento de peso y largura fetal, así como en el diámetro y en el peso placentario. Se observó aún la disminución de la parasitemia. No ocurrieron alteraciones significativas en las concentraciones de NO y en el número de nidos de amastigotas en el corazón. La evaluación histológica de las placentas mostró elevado número de nidos de amastigotas en los animales del grupo infectado y tratado. La reducción de la concentración de citocinas proinflamatorias y de poblaciones de células T desencadenó una respuesta al padrón TH-2, característico de la gestación, fato que probablemente contribuye en el aumento del parasitismo placentario encontrado en los animales tratados con el Se. Así, es posible que la administración del Se durante la preñez podría alterar la respuesta inmune placentaria local, favoreciendo la instalación del parásita. Más estudios serán necesarios para evaluar la interacción entre el Se y la enfermedad de Chagas durante la preñez.

Palabras llave: Selenio; Enfermedad de Chagas; Gestación; Placenta; Rata.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de parasitas/mL de sangue nos animais infectados i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI - 8º dia de infecção), fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS - 8º dia de infecção), fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI - 15º dia de infecção), fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS - 15º dia de infecção).....26
- Figura 2.** Pesos cardíacos nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS).....28
- Figura 3.** Peso das placentas nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS); $H_0 \neq H_1$; ^+médica ; $^*p < 0,05$ (PC vs PI; PC vs PIS; PCS vs PIS e PI vs PIS).....29
- Figura 4.** . Diâmetro das placentas das ratas controles e infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* (15º dia de infecção e 18º da prenhez), nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS).....30
- Figura 5.** Peso dos fetos nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....31

Figura 6. Comprimento dos fetos nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....32

Figura 7. Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mL dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS)33

Figura 8. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais sem ou com estimulação com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas dos diferentes grupos experimentais analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS).....34

Figura 9. Análise fenotípica de CD161⁺ (células NK) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS),.....35

Figura 10. Análise fenotípica de CD4⁺ (células T CD3⁺CD4⁺) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....36

Figura 11. . Análise fenotípica de CD8⁺ (células T CD3⁺CD8⁺) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....37

Figura 12. Análise fenotípica de CD45⁺ (células B) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....38

Figura 13. Concentrações de IL-2 (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....39

Figura 14. Concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....40

Figura 15. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º

dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....41

Figura 16. Concentrações de TGF- β (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS).....43

Figura 17. Número de ninhos de amastigota observados nos cortes histológicos das placentas dos grupos infectados, no 15º dia de infecção, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS).....44

Figura 18. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas sem infecção (PC). A. Visão panorâmica de todas as regiões da placenta (100x). B. Camada decídua (400x). C. Camada esponjosa (400x). D. Região Labiríntica (400x). Hematoxilina-eosina.....45

Figura 19. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), 15º dia de infecção. A. Presença de pequeno ninho na placenta. B. Ninho de tamanho médio na região decídua. C. Presença de ninho em uma célula gigante. D. Ninho de amastigota. E. Presença de pequeno ninho de amastigota (400x). F. Mesma figura anterior no aumento de 1000x. Hematoxilina-eosina (400x).....47

Figura 20. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Ninho grande na camada decídua (100x). B. Ninho de amastigota também na camada decídua (400x). C. Presença de dois ninhos na camada decídua (400x). Hematoxilina-eosina.....48

Figura 21. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A, B, C e D - Ninhos de amastigotas presentes nas células gigantes (400x). Hematoxilina-eosina.....49

Figura 22: Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Ninho grande de amastigota na região labiríntica visível no menor aumento (100x). B. Figura anterior (400x). C. Ninho de amastigota na região labiríntica (400x). Hematoxilina-eosina.....50

Figura 23. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Intenso parasitismo com presença de amastigotas na região labiríntica (400x). B e C. Ninhos de amastigota na região labiríntica (400x e 1000x, respectivamente). Hematoxilina-eosina.....51

Figura 24. Ninhos de amastigota observados nos cortes histológicos do coração dos grupos infectados i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS).....52

Figura 25. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas não infectadas e sem tratamento (PC). A e B. Aspecto histológico do tecido cardíaco (400x). Hematoxilina-eosina.....53

Figura 26. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas infectadas sem tratamento (PI), 15º dia de infecção, mostrando pequeno ninho de amastigota (A) e um ninho de maior tamanho (B). Hematoxilina-eosina (400x).....55

Figura 27. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de

infecção. A. Pequeno ninho de amastigotas no coração. B. Ninho de amastigotas de tamanho maior, com células inflamatórias ao redor. Hematoxilina-eosina (400x).....56

Figura 28. Fluxograma que resume os resultados da administração de selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*.....58

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Poli-vitamínicos mais comuns no mercado brasileiro (nome, fabricante e concentração de selênio). Apenas três deles possuem selênio e a dosagem diária está acima da recomendada pela EPA (Environmental Protection Agency – USA) que é de 5 mcg, mas em uma dosagem bem inferior à considerada segura (126 a 819 mcg/dia).....16

Tabela 2. Número total de fetos/placentas das fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS).....27

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WHO World Health Organization

MTT [3-(4,5 – dimethylthiazol – 2 – yl) – 2,5 – diphenyltetrazolium bromide]

UI Unidade Internacional

μl Microlitro

nm Nanomolar

DHEA Dehidro-Epi-Androsterona

DMSO Dimetilsulfóxido

T. cruzi *Trypanosoma cruzi*

RPMI Meio de Cultura Roswell Park Memorial Institute

SF Soro Bovino Fetal

PC Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento

PCS Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio

PI Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* no 3º dia de prenhez, sem tratamento

PIS Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* no 3º dia de prenhez e tratadas com selênio

IFN-γ Interferon Gama

IgG Imunoglobulina G

IL-1 Interleucina 1

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

LPS Lipopolissacarídeo

MHC Complexo principal de Histocompatibilidade

NK Células natural Killer

NO Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NOS Óxido Nítrico Sintetase

Th T helper

TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa

Se Selênio

GPx Glutathione Peroxidase

DNA Ácido desoxirribonucleico

GPI glicosil-fosfatidil-inositol

GIPL glico-inositol-fosfolípideo

TGF- β Fator de transformação de crescimento

PCR Reação em cadeia de Polimerase

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

NOS Enzima produtora de óxido nítrico

NADP Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

BNZ Benzonidazol

NF Nifurtimox

OMS Organização Mundial de Saúde

IFAT Imunofluorescência indireta

EPA Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental Americana)

LOAEL Nível em que se observa efeito adverso mínimo

G Unidades gravidade

TMB- Tetrametilbenzidina

FITC Fluoresceinisotiocianato

PBS phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

U Valor Mann-Whitney

EROs Espécies reativas de oxigênio

HTLV-1 Human T lymphotropic virus type 1 (Vírus linfotrópico da célula humana do tipo 1)

MIF Migration inhibitory factor

Tregs Células T regulatórias

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas e Infecção Congênita

A doença de Chagas, considerada um dos maiores problemas de saúde pública na América Latina é causada por diferentes populações do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença afeta mais de 18 milhões de pessoas, colocando em risco mais de 20 milhões de indivíduos na América do Sul e América Central. Estima-se que a mortalidade causada por esta enfermidade no ano de 2008 foi de aproximadamente 10.000 pessoas; é considerada uma doença tropical negligenciada, gerando impacto na economia e na qualidade de vida da população (WHO, 2013).

O parasita é transmitido aos seres humanos e outros mamíferos através de um inseto da família Triatominae, conhecido popularmente como “barbeiro”. Outras vias de transmissão estão implicadas como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congenitamente, por via oral através da ingestão de alimentos contaminados com fezes de triatomíneo, pelo leite materno e coito (WHO, 2013).

Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico brasileiro, foi designado por seu mentor Oswaldo Cruz, no ano de 1907, a investigar e controlar um surto de malária no município de Lassance, estado de Minas Gerais, Brasil, e realizou uma das mais notáveis descobertas da medicina (MONCAYO, 2008). Carlos Chagas encontrou no intestino médio de um inseto triatomíneo, formas flageladas de um parasita que posteriormente foi denominado *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz. Na procura de possíveis hospedeiros vertebrados, conheceu a menina Berenice, uma criança de dois anos infectada pelo parasita, sendo este o primeiro caso documentado da doença (ANDRADE, 2005; CHAGAS, 1909). Fato único na história, Carlos Chagas, com poucos recursos humanos e materiais conseguiu estabelecer a etiologia, o ciclo da parasitose, os reservatórios domésticos e silvestres, o diagnóstico, a patologia e a epidemiologia da doença que recebeu seu nome. Essa descoberta proporcionou que concorresse por duas vezes (1913 e 1921) ao Prêmio Nobel de Medicina (DIAS et al., 2008).

A doença de Chagas existe nas Américas há milhares de anos como uma enfermidade enzoótica (ou seja, de animais silvestres). Os vetores mais comuns são

Triatoma, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Hemiptera; Reduviidae), mas também outros gêneros são descritos como transmissores. Mais de 150 espécies de triatomíneos e mais de 100 espécies de mamíferos (em sua maioria, silvestres) são responsáveis pela manutenção do ciclo de *T. cruzi* na natureza (COURA, 2010). A distribuição do vetor e reservatórios de *T. cruzi* nas Américas se estende do sul dos Estados Unidos até a Argentina e Chile, no total de 22 países endêmicos para a doença no continente (COURA, 2010).

O homem chegou à América entre 26.000 e 12.000 anos atrás (ARAÚJO et al., 2009) e com a atividade agrícola e domesticação de animais ocasionou, a cerca de 10.000 anos, a infecção acidental ao homem (caracterizando a doença como uma antroponose). Além disso, DNA de *T. cruzi* foi encontrado em múmias com mais de 9.000 anos no norte do Chile e sul do Peru, mostrando evidência da presença de triatomíneos em habitações humanas em tempos pré-colombianos (COURA 2010; AUFDERHEIDE et al., 2004). Nos últimos 200 ou 300 anos, com o progressivo desmatamento para agricultura e pecuária, e a abertura de rotas de transporte ferroviário e rodoviário, o triatomíneo gradualmente foi perdendo sua fonte primária de alimento (animais silvestres), e ao mesmo tempo se adaptou às habitações humanas, tendo agora, como fonte alimentar, animais domésticos e seres humanos. Dessa forma, um novo ciclo de infecção foi estabelecido e a doença de Chagas se tornou uma zoonose (doença transmitida entre animais e humanos endemicamente) (COURA, 2009; COURA, 2010).

Trypanosoma cruzi apresenta ciclo de vida complexo que envolve hospedeiro mamífero e inseto vetor (triatomíneo). Possui quatro estágios evolutivos: tripomastigota sanguínea, amastigota, epimastigota e tripomastigota metacíclica. No ciclo evolutivo do parasita, o vetor ingere a forma tripomastigota do hospedeiro mamífero que se transforma em epimastigota, sofrendo divisão binária no intestino do vetor. Após três a quatro semanas, as formas epimastigotas se convertem em tripomastigotas metacíclicas que migram para a porção posterior do intestino do inseto. A transmissão para um novo hospedeiro mamífero ocorre pelas fezes contaminadas contendo o parasita, que penetra pela solução de continuidade da pele em consequência da picada do inseto, ou através de superfícies membranosas tais como mucosa nasal, oral ou conjuntiva (NAGAJYOTHI et al., 2012).

A doença apresenta duas fases: fase aguda e fase crônica. A fase aguda se estende por até dois meses após a infecção, apresentando parasitemia elevada. Na maioria dos casos, nessa primeira fase, os sintomas são ausentes ou leves, mas podem incluir febre, cefaleia, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade respiratória, inchaço, dor abdominal ou no peito. Menos de 50% dos casos em que a pessoa é picada pelo vetor, tem-se os sinais clássicos da invasão do parasita, com lesão na pele ou pálpebra (sinal de Romana, edema bi-palpebral unilateral). Na fase crônica, a parasitemia diminui e o protozoário permanece em tecidos específicos, dependendo da linhagem e tropismo da cepa, sendo encontrado principalmente no músculo cardíaco e/ou trato digestivo. Até 30% dos indivíduos infectados sofrem de distúrbios cardíacos e cerca de 10% sofrem de transtornos digestivos (mega-cólon e mega-esôfago) (COURA, 2009). A doença pode levar à morte súbita ou a insuficiência cardíaca causada pelas lesões progressivas no coração (WHO, 2013; COURA, 2009; RASSI et al., 2010).

Os programas de controle da transmissão vetorial resultaram na diminuição do número de casos da doença nas últimas décadas, entretanto a transmissão congênita ganhou importância epidemiológica (KIRCHHOFF, 1999; LAMBERT et al., 2006). Estima-se que 14 milhões de pessoas provenientes de países onde a doença é endêmica, tenham migrado para a América do Norte, Europa, Japão e Austrália levando a chamada “globalização da doença de Chagas” (SCHMUNIS, 2007).

LOPES et al. (1995) analisaram os efeitos da transmissão congênita em regiões livres do vetor (não endêmicas), constatando aumento no risco de aborto, parto prematuro, infecção neonatal, morte ou graves sequelas no feto. JACKSON et al. (2009) observaram baixo número de transmissão congênita em países não endêmicos da doença. Este fato é explicado pela ausência de uma rotina de diagnóstico pré-natal em mulheres muitas vezes em situação ilegal nesses países, assistência só obtida ao final da gestação ou mesmo na hora do parto. Esses mesmos autores ainda comentam que a doença de Chagas é rara na Europa e os sistemas de saúde simplesmente não realizam o diagnóstico da doença. Somado a isso um terço dos bebês recém-nascidos infectados são assintomáticos e a transmissão congênita não é diagnosticada. Baseado nestes fatos, o Hospital Universitário da Suíça, realiza desde janeiro de 2008 testes sorológicos para

detecção da doença de Chagas em todas as mulheres provenientes do México e América do Sul e Central (JACKSON et al., 2009).

Os requisitos para considerar comprovada a transmissão congênita são os seguintes: 1) Mães *T. cruzi* soropositivas; 2) Detecção pós-parto de parasita no recém-nascido; ou 3) Detecção pós-parto de parasita ou de anticorpos específicos anti - *T. cruzi* (produzidos pela criança) em momento posterior (já que o resultado pode ser mal interpretado com a presença de anticorpos recebidos da mãe). A infecção congênita por *T. cruzi* está associada com parto prematuro, baixo peso e morte; cerca de 50% das crianças nascidas de mães infectadas não sobrevivem (KEMMERLING et al., 2010; CARLIER, 2005).

Durante a gravidez tem-se um predomínio de uma resposta imune Th2, que favorece uma tolerância imunológica ao feto, mas, com isso, há um aumento da susceptibilidade a certas doenças autoimunes e infecção (KEMMERLING et al., 2010; LIN et al., 2005; RAGHUPATHY, 2001). Mães transmissoras do parasita apresentam parasitemia elevada e capacidade diminuída na produção de IFN- γ e de IL-2 em resposta específica ao parasita; possui alta capacidade em produzir IL-10 (citocina anti-inflamatória) e baixos níveis de TNF- α circulante (KEMMERLING et al. 2010; HERMANN et al., 2004; CARLIER, 2005; ALONSO-VEGA et al., 2005). Tal processo reforça o estudo da transmissão congênita na doença de Chagas visto que o ambiente favorável está presente com as alterações metabólicas decorrentes da gestação.

Há poucos trabalhos que mostram as lesões na placenta de mães chagásicas, sejam elas transmissoras ou não da doença. As lesões descritas são corioamnionite e edema do cordão umbilical (KEMMERLING et al., 2010; FERNANDEZ-AGUILAR et al., 2005).

HERMANN et al. (2004) estudaram mães infectadas que transmitiram o parasita, mães infectadas com bebês saudáveis e mães saudáveis com bebês saudáveis, observaram que a transmissão vertical da doença está associada com alta carga parasitária. Neste estudo os autores associaram a transmissão congênita com diminuição da produção de IFN- γ pelas células maternas em resposta à presença de antígeno.

1.2. Invasão do Parasita

Trypanosoma cruzi pode apresentar cepas com tripomastigotas de formato delgado ou largo; nas formas largas o cinetoplasto (estrutura complexa, constituída de grânulos basais, fibrilas associadas e corpos relacionados) é próximo à extremidade posterior, o núcleo é ovóide e mais denso e o flagelo mais longo. As formas finas têm cinetoplasto afastado da extremidade posterior, aspecto sinuoso do corpo, flagelo curto e núcleo difuso; estas formas são mais bem adaptadas a entrar nas células dos tecidos. Formas largas permanecem por mais tempo no sangue enquanto as formas delgadas rapidamente entram no ciclo tecidual (DIAS, 1934; BRENER, 1965; BRENER, 1969).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o tripomastigota metacíclico invade diferentes células do hospedeiro como macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Para tal o processo de endocitose e formação do vacúolo parasitóforo são utilizados para o reconhecimento e internalização até a diferenciação na forma amastigota (ANDRADE et al., 2005).

As etapas da interação entre a célula hospedeira e o parasita estão divididas em três fases: 1. Adesão e reconhecimento; 2. Sinalização; 3. Invasão (DE SOUZA et al., 2010). A invasão da célula e as estratégias de evasão do sistema imune são essenciais para a sobrevivência e replicação de *T. cruzi* em vertebrados (ANDRADE et al., 2005). Nesse processo, o parasita faz uso de uma ampla variedade de moléculas de interação célula a célula, algumas descritas a seguir.

As GPI mucinas (glicosil-fosfatidil-inositol) e GPIs (glico-inositol-fosfolipídeo), abrangem os grupos mais abundantes de moléculas de superfície de *T. cruzi* (BUSCAGLIA et al., 2006), que estão relacionadas com a aderência aos tecidos e variação superficial do parasita (DOS REIS, 2011; BUSCAGLIA et al., 2006). As trans-sialidases são uma família de proteínas do grande grupo das GPI mucinas, composta por mais de 140 moléculas que são responsáveis pela característica invasiva do parasita (BUSCAGLIA et al., 2006); elas interagem diretamente com glicoproteínas aceptoras de linfócitos do hospedeiro (MUCCI et al., 2006), estimulando a proliferação de células T CD4⁺ e aumentando a produção de citocinas através da interação com mucinas de linfócito T CD43⁺ (TODESCHINI et

al., 2002); as trans-sialidases também induzem a apoptose de linfócitos (MUCCI et al., 2006).

A gp90, um dos tipos de GPI-mucina, está presente nos estágios de *T. cruzi* presentes no mamífero. Esta molécula parece ter atividade semelhante a glicosidase e sua atividade antifagocitária é mediada pela remoção de resíduos de açúcar, necessários para a internalização do parasita (DE SOUZA et al., 2010; NOGUEIRA, 1983). Moléculas conhecidas como “*mucinas*” (glicoproteína presente em maior quantidade na superfície de *T. cruzi*) estão relacionadas com a ligação do parasita e a invasão (DE SOUZA et al., 2010; VILLALTA et al., 1984; YOSHIDA et al., 1989), assim como as moléculas da família Tc85, um tipo de trans-sialidase (única enzima na superfície de *T. cruzi* que facilita a invasão), gp83 (presente em todas as linhagens do parasita e responsável pelo ataque e entrada do protozoário em células fagocíticas e não fagocíticas), e a penetrina (que tem afinidade por matriz celular) (DE SOUZA et al., 2010; VILLALTA et al., 2008; LIMA et al., 1988).

A entrada do parasita é uma associação entre moléculas de *T. cruzi* e do hospedeiro, sendo potenciais parceiros nessa interação e reconhecimento. Proteínas, glicoproteínas e receptores Toll-like 4 e 9 do hospedeiro estão envolvidos no processo de adesão (DOS REIS, 2011; ANDRADE et al., 2005; SCHMITZ et al., 2009). Receptores Toll-like (TLR) são uma família de receptores de reconhecimento de patógenos, expressos por fagócitos e outras células que fazem um patrulhamento no nosso organismo, desempenhando um importante papel na resposta contra *T. cruzi*, assessorando células na geração de uma resposta imune mediada por linfócitos T e B (DOS REIS, 2011; ANDRADE et al., 2005). Proteínas do tipo lectina são responsáveis pela entrada do parasita em células dendríticas e músculo liso (MING et al., 1995). Além disso, o parasita usa outras moléculas do hospedeiro para a sua invasão, como integrinas, receptores de TGF- β , receptores de bradicinina, entre outros (DOS REIS, 2011; ANDRADE et al., 2005).

Após a ligação e reconhecimento do parasita na superfície da célula do hospedeiro, começa o processo de sinalização que resultará na entrada de *T. cruzi*, que pode ser por fagocitose (emissão de pseudópodes, realizado por macrófagos); por endocitose (sem pseudópodes, mas com participação de filamentos de actina) ou por invaginação (sem o envolvimento de filamentos de actina) (DE SOUZA et al.,

2010). No início da interação há um aumento transitório nos níveis citoplasmáticos de Ca^{+} , tanto no hospedeiro quanto no parasita (YOSHIDA et al., 2008; WILKOWSKY et al., 1996; GARZONI et al., 2003).

Células não fagocíticas apresentam dois tipos de vias de invasão do parasita: 1) via lisossomo-dependente, onde há recrutamento de lisossomos no local da invasão; e 2) lisossomo-independente, que é mediada pela membrana plasmática (DE SOUZA et al., 2010). Na doença de Chagas, a invasão e colonização de determinados tipos de tecido, como o muscular, é necessário o entendimento de como células não-fagocíticas adquirem o *T. cruzi* (ANDRADE et al., 2005). No primeiro processo de internalização do parasita em células não-fagocíticas, lisossomos são recrutados ao local de entrada da forma tripomastigota e se fundem com a membrana plasmática, fornecendo membrana para a formação do vacúolo parasitóforo (ANDRADE et al., 2005; TARDIEUX et al., 1992). Este processo é dependente da sinalização por Ca^{+} (ANDRADE et al., 2005; TARDIEUX et al., 1994; RODRÍGUEZ et al., 1999). No outro método de invasão do parasita, ocorre invaginação, gerando um vacúolo intracelular que posteriormente se funde com lisossomos, ambos completamente independentes da polimerização de actina pela célula do hospedeiro (DOS REIS, 2011; ANDRADE et al., 2005).

No vacúolo, os tripomastigotas lançam trans-sialidases e neuramidases que irão retirar resíduos de ácido siálico da membrana desta organela, tornando-o sensível à ação do Tc-Tox (um peptídeo que é similar ao fator 9 do sistema complemento). Dentro do pH ácido do vacúolo, o Tc-Tox irá formar poros na membrana do mesmo. A formação destes poros junto com a ação de enzimas transialidases e neuramidases irá romper o vacúolo. A forma tripomastigota, inicia o processo de diferenciação em amastigota ainda dentro vacúolo parasitóforo durante a fragmentação da membrana, em torno de duas horas após a infecção (DE SOUZA et al., 2010). Depois de sair do vacúolo parasitóforo, a forma amastigota se replica livremente no citoplasma. Após nove ciclos de divisão binária, essas se transformam em tripomastigotas que são lançados na circulação após ruptura da célula do hospedeiro (DE SOUZA et al., 2010). Esses eventos são responsáveis pelos sintomas da fase aguda da doença, caracterizada por alta parasitemia e sintomatologia variada (DE SOUZA et al., 2010).

1.3. Resposta Imune na Doença de Chagas

A resposta imune inata celular apresenta um papel importante no controle da doença de Chagas na fase aguda da infecção, com a produção de mediadores inflamatórios como IL-12, TNF- α e NO. A citocina IL-12 é a chave para a produção de IFN- γ , este produzido pela indução de células Th1 e células NK (natural killer). O IFN- γ ativa macrófagos, causando a morte de patógenos intracelulares. A morte do parasita é mediada pelo NO produzido por macrófago ativado. Durante a fase inicial da doença, essas moléculas agem coordenadamente, controlando a multiplicação parasitária (MACHADO et al., 2004).

Na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, ocorre uma severa atrofia tímica devido à intensa depleção de timócitos corticais via apoptose (LEITE DE MORAES et al., 1992). Essa depleção observada é mediada por glicocorticóides (PÉREZ et al., 2012) e o TNF- α age na liberação deste hormônio durante a doença. Os glicocorticóides possuem ação antiinflamatória, imunossupressora e imunomoduladora, levando à supressão da produção de citocinas padrão Th1, que desvia a resposta para um padrão Th2. É importante ressaltar que embora a ação imunomoduladora exerça proteção contra a excessiva inflamação, tal ação altera a resposta imune, já que a resposta Th1 é protetora.

Sabe-se que a resposta imune do tipo Th1 é voltada para patógenos intracelulares e a resposta do tipo Th2, acredita-se ter uma ênfase maior para patógenos pluricelulares (KIDD et al., 2003). A resposta adaptativa contra os protozoários ocorre depois de apresentação de antígenos às células T (através de macrófagos e células dendríticas), via MHC classe II. Como outras células podem ser infectadas, e macrófagos e células dendríticas também expressam moléculas de MHC classe I, nas infecções por protozoários também ocorre ativação das células TCD8⁺ (CARVALHO et al., 2004).

Uma resposta Th2 seria considerada “maléfica” porque aumenta a susceptibilidade às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito, o que pode levar a crer que a resposta Th1 seja uma melhor alternativa; no entanto, sua expressão exacerbada pode causar grande destruição tecidual e doenças autoimunes. Portanto uma ação equilibrada do sistema imune é essencial para a contenção da doença sem dano tecidual (CARVALHO et al., 2004). Com isso, a fim

de não colocar em risco a homeostasia, a resposta inicial mediada por citocinas pró-inflamatórias (Th1), é balanceada pela contenção de uma resposta anti-inflamatória (Th2), mediada por IL-10 e TGF- β , desempenhando um papel crítico na resposta imune do hospedeiro, promovendo a persistência do parasita. Ilustra bem esse equilíbrio o conhecimento de que no pico de parasitemia, o infiltrado de células inflamatórias no coração, contém células T expressando citocinas tanto do tipo Th1 quanto Th2 (CARVALHO et al., 2004).

1.4. Óxido Nítrico (NO)

Durante a década de 90 foi descoberta uma molécula de baixo peso molecular denominada de óxido nítrico (NO), derivado do aminoácido L-arginina pela ação da enzima NO sintetase (NOS). Diversas células são responsáveis por sua produção como macrófagos ativados por citocinas, agentes microbianos ou ambos. Ao longo do tempo, inúmeras pesquisas foram feitas confirmando a participação efetiva do NO na resposta imune contra patógenos, bem como suas funções antitumorais e microbicidas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOGDAN, 2000; TRIPATHI et al., 2007).

O NO é produto da conversão da L-arginina a L-citrulina pela óxido nítrico-sintetase, na presença de NADPH como co-fator, sendo de importância vital nos processos fisiológicos, mas podendo causar lesão tecidual (NAHREVANIAN, 2009). Tem a habilidade de difusão livre entre membranas, oferecendo novas perspectivas de comunicação célula a célula. As enzimas produtoras de NO, denominadas óxido nítrico sintase (NOS) são classificadas como constitutiva, endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) (MAYER et al., 1998).

A enzima iNOS foi descrita como sendo expressa por macrófagos ativados, contribuindo para o controle da replicação e/ou morte celular de patógenos (NAHREVANIAN, 2009; BOGDAN, 2000). Um grande número de células produz e responde aos estímulos do NO (TRIPATHI et al., 2007), participando na defesa imunológica, regularização da pressão sanguínea e inibição da agregação plaquetária (LOWENSTEIN et al., 1994; BOGDAN, 2000). No caso de inflamação e infecção, há uma expressão generalizada das enzimas produtoras de NO pelo hospedeiro, em resposta a estímulos nocivos e virulentos de um patógeno. O aumento dessa substância tem sido descrita no controle de patógenos, incluindo protozoários, fungos, vírus e bactérias (GUTIERREZ et al., 2009; TRIPATHI et al., 2007). Uma hipótese da ação do NO, está na capacidade microbicida do mesmo, interagindo com grupamentos ferro e tiol, formando complexos que inativam enzimas cruciais na respiração mitocondrial ou na replicação do DNA (GUTIERREZ et al., 2009). Além disso, o NO reage com espécies reativas de oxigênio (EROS) capazes de danificar células alvo (TRIPATHI et al., 2007).

O reconhecimento da molécula GPI-mucina, na superfície de *T. cruzi*, pelo sistema imune, é um potente indutor na produção de NO, assim como a produção de IFN- γ na fase aguda da doença de Chagas. Durante a infecção por *T. cruzi*, o NO pode agir direta ou indiretamente, intervindo na maquinaria leucocitária de diversas formas. Este processo envolve a geração de radicais livres tóxicos (peróxido-nitrito e superóxido), onde o NO modifica quimicamente proteínas contendo cisteína e/ou se liga a metalo-proteínas que regulam processos metabólicos essenciais. A toxicidade do NO frente ao parasita difere de acordo com a cepa e o microambiente fisiológico envolvido (GUTIERREZ et al., 2009).

1.5. Tratamento

Cem anos após a descoberta da doença de Chagas existem poucas opções efetivas de tratamento. A terapia atual data das décadas de 1970/80 e é baseada no uso de derivados nitroheterocíclicos que muitas vezes geram resultados insatisfatórios. Atualmente são utilizados no tratamento dois medicamentos: benzonidazol (BNZ) e nifurtimox (NF). Estes medicamentos são efetivos na fase aguda da infecção, porém o índice de cura na fase crônica é baixo (BOSCARDIN et al., 2010). Além disso, o período de tratamento é prolongado (30 a 60 dias) apresentando efeitos colaterais graves. O benzonidazol pode causar alterações cutâneas, síndrome de Stevens-Johnson; o nifurtimox, que não é mais utilizado no Brasil, está associado a danos neurofísicos e gastrointestinais na maioria dos pacientes, sendo que apenas metade dos pacientes tolera o tratamento completo (APT, 2010).

O NF age através da produção de radicais livres, ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e metabólicos eletrofílicos. O BNZ inibe a síntese de proteínas, causando degradação na biossíntese de macromoléculas; há interação com o DNA do parasita além da droga inibir a cadeia respiratória (APT, 2010). Os efeitos colaterais ocorrem principalmente em adultos, crianças e recém-nascidos toleram melhor a medicação. O tratamento é contra-indicado durante a gestação devido aos possíveis efeitos teratogênicos. Se comprovada a transmissão congênita o tratamento deve começar o mais breve possível, sendo os melhores resultados obtidos quanto mais precoce for o diagnóstico. Muitas vezes no tratamento é necessária a associação com fenobarbital para evitar o aparecimento de efeitos adversos como convulsões, ou de anti-histamínicos no caso de reações dermatológicas secundárias (APT, 2010).

Nos últimos anos, tratamentos utilizando medicamentos novos e antigos tem sido propostos no combate à doença de Chagas. Uma das propostas mais promissoras, devido ao seu duplo mecanismo de ação, é um agente antiarrítmico derivado de benzofurano, a amiodarona (BENAIM et al., 2012).

1.6. Selênio

O selênio (Se) foi descoberto pelo químico suíço Jöns Jacob Berzelius em 1817 (OLDFIELD, 1987; MISTRY et al., 2012) e originalmente visto como tóxico. Ele foi reconhecido como elemento traço essencial em 1957 (SMALL-HOWARD et al., 2005).

O selênio é incorporado na forma de aminoácido como seleno-cisteína em mais de 25 proteínas, sendo que metade destas ainda tem função desconhecida (BECKETT et al., 2005). Os papéis biológicos descritos incluem prevenção de câncer, doença cardiovascular e mutação viral; além disso, é um elemento essencial para a função endócrina, imunológica e na resposta inflamatória (HATFIELD et al., 2006).

Muitas proteínas caracterizadas possuem funções antioxidantes ou oxidoredutases, incluindo glutathione peroxidase (GPx), tireodoxina redutases, entre outras (PAPP et al., 2009). As GPx são conhecidas como os principais componentes de defesa antioxidante, com cinco isoenzimas (GPx1, 2, 3, 4 e 6), sendo a primeira classe de seleno-proteínas identificada. A GPx catalisa a oxidação da glutathione e permite a redução do peróxido de hidrogênio a água, prevenindo a peroxidação lipídica e dano celular (PATRICK, 2004; IMAI et al., 2003; ROTRUCK et al., 1973). Há basicamente cinco formas de GPx identificadas em tecidos humanos: GPx clássica (encontrada no citosol de células); GPx gastrointestinal (encontrada no fígado e trato gastrointestinal); GPx de plasma; GPx fosfolipídico-hidroperóxido (PHGPx, encontrada na membrana celular) e GPx núcleo espermática (PATRICK, 2004). A PHGPx aparece em células nucleadas, mitocôndria e no citosol, agindo especificamente na prevenção da peroxidação lipídica de membranas celulares (PATRICK, 2004). Esta é uma ação exclusiva dessa enzima e, assim como a maioria das outras enzimas antioxidantes, não pode reduzir hidroperóxido de fosfolípidos no interior de membranas celulares (PATRICK 2004; IMAI et al., 2003). A PHGPx regula a produção de eicosanóides e a sinalização celular por espécies reativas de oxigênio. Membranas de fosfolípidos ricas em PHGPx são menos afetadas por deficiência de selênio (PAPP et al., 2009; PATRICK, 2004).

A EPA (Environmental Protection Agency - USA – Agência de Proteção Ambiental Americana) determina que a concentração de selênio, baseado em sua

meia vida de exposição é de 5mcg/Kg de peso corporal ao dia. O nível de selênio em que se observa o mínimo de efeito adverso (*LOAEL*) foi calculado entre 1540 – 653 mcg/dia. A dose de selênio em que não se observa efeito adverso (*NOAEL*) foi calculada entre 819 e 126 mcg/dia (WHANGER et al., 1996; PATRICK, 2004).

Reduzidas concentrações séricas de selênio são encontradas em pessoas que residem em regiões com baixo teor de selênio no solo, como em regiões vulcânicas. Doenças relacionadas a essa baixa concentração são observadas na China e Tibet. A doença de Keshan, uma cardiopatia endêmica reversível, se caracteriza por uma necrose focal do miocárdio, normalmente associada com infiltrado inflamatório e calcificação, proporcionada pela combinação entre deficiência de selênio e infecção pelo vírus coxsackie B (XU et al., 1997; BECK et al., 1998; RAYMAN, 2002). Esta desordem é exclusiva de áreas rurais da China e a suplementação com selênio gera proteção a mulheres susceptíveis durante a gravidez (MISTRY et al., 2012).

Dados referentes à fertilidade feminina e selênio são escassos. Há trabalhos relacionando pacientes com baixas concentrações foliculares de selênio com infertilidade não explicada (PASZKOWSKI et al., 1995; TARA et al., 2010). A suplementação com selênio em mulheres grávidas pode estar associada com baixa frequência de pré-eclâmpsia (TARA et al., 2010; MISTRY et al., 2012)

Durante a gravidez, pode ocorrer diminuição sérica de selênio, independente se há alguma complicação na gestação (FERRER et al., 1999; MIHAILOVIC et al., 2000). Esse fato é explicado pela hemo-diluição que ocorre no plasma materno durante a gravidez, pelo transporte deste elemento para o feto e também na produção de compostos antioxidantes, como a GPx e selenoproteína. Essa defesa antioxidante tem importante papel na modulação dos efeitos decorrentes da gestação, controlando o estresse oxidativo que pode estar associado com morbidade e mortalidade perinatal.

A literatura sugere que estresse oxidativo aumentado durante a gestação pode exercer papel importante em muitas doenças e causar efeitos adversos durante a gravidez, como aborto, pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, ruptura prematura de membrana e restrição no crescimento intrauterino (TARA et al., 2010). Baixas concentrações de Se foram observadas em mulheres que tiveram aborto no

primeiro trimestre de gestação, que não pode ser explicado apenas pela hemodiluição (já que os níveis de albumina permaneceram similares aos do grupo controle), mas também pelo dano ao DNA celular gerado com a perda da atividade antioxidante que o selênio proporciona (TARA et al., 2010). Também foi observado baixos níveis de atividade da GPx em eritrócitos e plasma na comparação entre mulheres grávidas e não grávidas (TARA et al., 2010).

O receptor ApoER2, específico para selenoproteína P (Sel P), predominantemente expresso na superfície de células do cérebro e testículo, teve a expressão de seu RNAm observado também na placenta (ANAN et al., 2009; KIM et al., 1996). A Sel P age como um transportador de Se inorgânico (selenito e selenato) para o feto, via placenta. O selênio inorgânico, tais como selenito e selenato, é transformado, preferencialmente, em Sel P e esta é efetivamente incorporada à placenta pelo receptor específico, ApoER2, durante a gestação. O selênio incorporado à metionina (SeMet) parece ter um mecanismo próprio de transferência, sem incorporação à Sel P, e parece ser uma melhor fonte nutricional de Se para filhotes do que o Se inorgânico (ANAN et al., 2009). Com exceção do rim, a concentração total de selênio no plasma e tecidos é afetada pela gestação e lactação (ANAN et al., 2009).

A prescrição de poli-vitamínicos na gestação é uma prática comum, uma vez que na gravidez, o suprimento insuficiente de vitaminas e minerais pode levar a um estado biológico de competição entre mãe e feto, que pode ser prejudicial a ambos (KING, 2003). Somado a isso, a concentração de selênio e a atividade da glutationala peroxidase diminuem durante a gestação (concentração de selênio no primeiro trimestre de gestação é de 65 µg/L, enquanto que no terceiro trimestre é de 50 µg/L) (ZACHARA et., 1993; MIHAILOVIC et al., 2000); além disso, a concentração de selênio é menor no bebê em comparação à mãe (mães apresentam, em média, concentração plasmática de Se de 58,4 µg/L, já a concentração de Se no cordão umbilical é de 42,1 µg/L). É evidente a importância do Se na nutrição da mãe e do feto, e se faz necessária a verificação de qual suplementação disponível no mercado possui Se agregado (WHANGER et al., 1996; PATRICK, 2004). A Tabela 1 mostra alguns exemplos de poli vitamínicos que contém ou não selênio e a dosagem deste elemento.

Tabela 1. Poli-vitamínicos mais comuns no mercado brasileiro (nome, fabricante e concentração de selênio). Apenas três deles possuem selênio e a dosagem diária está acima da recomendada pela EPA (Environmental Protection Agency – USA) que é de 5 mcg, mas em uma dosagem bem inferior à considerada segura (126 a 819 mcg/dia) (WHANGER et al., 1996; PATRICK, 2004).

Nome Fantasia	Fabricante	Concentração de Selênio
Natele®	Bayer®	-
Materna®	Wyeth®	25,0 mcg
Damater®	Schering-Plough®	-
Femme®	ACHÈ®	-
Centrum®	Wyeth®	20,0 mcg
Laneli®	Medley®	-
All Nutri Plus®	Sundown®	20,0 mcg

1.7. O Selênio e a Doença de Chagas

Em áreas endêmicas da doença de Chagas, a população também é afetada pela má nutrição e muitos estudos correlacionam o efeito nutricional no curso da infecção por *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1995; RIVERA et al., 2002). A nutrição tem influência profunda sobre o sistema imune e sua deficiência pode prejudicar a resposta imune e levar a diminuição da resistência frente às infecções tanto em animais quanto em humanos.

O selênio exerce um importante papel no controle da cardiopatia na doença de Chagas. A cardiopatia causada pela doença de Chagas crônica está associada a baixos níveis de selênio (RIVERA et al., 2002; NÈVE, 1996).

A suplementação com este elemento essencial, não garante uma proteção total durante a infecção, mas pode proteger o músculo cardíaco da lesão causada pela inflamação ficando o benefício dessa suplementação na dependência da relação parasita-hospedeiro (DE SOUZA et al., 2003). GOMEZ et al. (2002) analisaram a relação entre selênio, doença de Chagas e miosite (inflamação do músculo). Neste estudo, a severidade da miosite foi mais intensa em camundongos deficientes de selênio, sendo frequentemente observada substituição de músculo esquelético por tecido fibrótico nestes animais. Assim, os autores concluíram que a deficiência de Se no hospedeiro murino aumenta a severidade da miopatia inflamatória crônica causada por *Trypanosoma cruzi*.

DE SOUZA et al. (2010) concluíram que uma suplementação com Se impede o aumento da câmara do ventrículo direito (aumento que é um marcador de severidade na doença de Chagas) e pode ser considerado como proposta de terapia adjuvante para as alterações cardíacas na infecção por *T. cruzi*. A administração de Se em ratos também se mostrou eficaz na melhora da motilidade intestinal, sendo sugerido como modulador da resposta inflamatória, imunológica e na resposta antioxidante envolvida nos distúrbios intestinais causados pelo parasita (DE SOUZA et al., 2010). Assim, uma nutrição deficiente de selênio está associada com alta mortalidade por *T. cruzi* (DE SOUZA et al., 2010), o que desperta o interesse do estudo desse mineral como provável adjuvante no desenvolvimento do feto e do quadro clínico geral frente a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da administração do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas por *T. cruzi*, na fase aguda da infecção, através da quantificação de parasitas sanguíneos e teciduais, bem como avaliar os efeitos desta substância na magnitude da resposta imune e desenvolvimento fetal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da administração de selênio em ratas prenhes durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, através da quantificação de parasitas sanguíneos;
- Avaliar os efeitos desta substância no parasitismo tecidual através do estudo histopatológico do coração, placenta e fetos.
- Avaliar o peso e o comprimento fetal, assim como o peso e diâmetro placentário de ratas tratadas com este nutriente;
- Verificar possíveis alterações na resposta imune de ratas infectadas e tratadas com selênio, através de dosagem de óxido nítrico e citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β ;
- Avaliar o efeito do selênio nas populações celulares de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, células NK, linfócitos B e macrófagos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

No experimento foram utilizadas 20 ratas fêmeas prenhas, da linhagem Wistar, adultos jovens (50-60 dias), pesando entre 200-220 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram mantidos no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, a uma temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12 horas, com água e ração *ad libitum*; a maravalha foi trocada três vezes por semana.

As ratas fêmeas foram colocadas para acasalamento com os machos durante a noite, na proporção de duas fêmeas para cada macho. A presença do tampão vaginal foi utilizado para a determinação do primeiro dia da prenhez. Após o acasalamento, as fêmeas prenhas foram mantidas em caixas individuais e receberam ração comercial e água *ad libitum*.

3.2. Grupos Experimentais

Grupos Controles (prenhas)

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

PCS - Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (n=5)

Grupos Infectados (prenhas)

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

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

3.3. Dias de Experimento

Os efeitos do selênio foram estudados na fase aguda da infecção de ratas Wistar prenhas. A parasitemia foi realizada no 8º e 15º dias de infecção. Os outros experimentos foram realizados no 15º dia de infecção, correspondendo ao 18º dia da prenhez.

3.4. Parasitas

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953). Esta cepa vem sendo mantida em camundongos Swiss, por repiques de sangue infectado a cada 7 dias. Em ratos, a curva parasitária apresenta pico compreendido entre o 7º e 15º dia da infecção (ANDRADE et al., 1974; UYEMURA et al., 1995).

3.5. Infecção

As ratas prenhas (grupo infectado) foram inoculadas no 3º dia de prenhez, via intraperitoneal, com 1×10^5 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*.

3.6. Administração de selênio

Os animais foram tratados via oral, com 0,2 mg de selênio / Kg de peso / dia (Sigma Aldrich, USA) (DE SOUZA et al., 2002), diluídos em água destilada, a partir do 4º dia da prenhez até o final da prenhez (18º dia). O selênio foi administrado uma vez ao dia, pela manhã, seguindo sempre o mesmo horário de tratamento.

3.7. Eutanasia dos animais

Os animais foram eutanasiados no 18º dia da prenhez, por decapitação, com prévia anestesia utilizando tribromoetanol (25mg/Kg/animal). Foi utilizada a decapitação para evitar que o estresse altere a resposta imune (SANTOS et al., 2005).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus da USP de Ribeirão Preto, protocolo nº 09.1.193.53.4.

3.8. Coleta de sangue

Para contagem dos parasitas sanguíneos (parasitemia) foram colhidos 5 μ L de sangue e para a determinação das citocinas foram colhidos 6 mL de sangue para obtenção de soro.

3.9. Parasitemia

A parasitemia foi realizada no 8º e 15º dias de infecção, utilizando o método de Brener (1965). Este método consiste em contar o número de tripomastigotas sanguícolas em 50 campos microscópicos, multiplicando este valor por um fator calculado para o microscópio utilizado.

3.10. Técnica Histológica

No 18º dia da prenhez, foram coletados o coração, placenta e fetos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Posteriormente os órgãos foram pesados em balança eletrônica (Mettler H10W), lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em ALFAC (mistura de álcool etílico, formol e ácido acético) durante 24 horas e mantidos em álcool 80% até a inclusão dos tecidos em parafina. Cortes histológicos de 6 μ m de espessura foram confeccionados e corados com hematoxilina e eosina. A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70 μ m (CAMARGOS et al., 2000). Os cortes histológicos foram examinados em microscópio óptico de luz branca (Zeiss) com aumento de 400x.

3.11. Contagem de parasitas teciduais

O parasitismo tecidual foi avaliado a partir da determinação do número de ninhos de amastigotas observados em todos os cortes histológicos (400X), sendo considerados todos os ninhos encontrados em cada campo microscópico (CASTRO & BERNER, 1985). A análise microscópica dos cortes histológicos foi realizada nos tecidos de cinco animais de cada grupo experimental.

3.12. Pesagem dos animais e órgãos

Antes de eutanasiados, os animais foram pesados em balança eletrônica Mettler. Imediatamente após a abertura da cavidade abdominal para a realização dos outros experimentos, as placentas e fetos foram retirados e pesados.

3.13. Taxa de mortalidade dos animais

Os animais dos diferentes grupos experimentais (tratados e não tratados) foram observados diariamente para verificação da taxa de mortalidade.

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

A quantificação de óxido nítrico foi feita com células do lavado peritoneal.

A cavidade peritoneal das ratas prenhas foi lavada com 5 mL de RPMI a 4°C. O lavado peritoneal foi recolhido e centrifugado por 15 minutos à 1500 G, sendo o sobrenadante desprezado. O “pellet” foi ressuscitado com 1ml de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Uma alíquota de 10 µL desta suspensão foi diluída em solução de Turk (990 µL) para contagem das células viáveis (macrófagos) em câmara de Neubauer; as concentrações das células foram acertadas para 5×10^6 cel/mL. Foi distribuído volume de 100 µL desta suspensão em placa de 96 poços, contendo 5×10^6 células/poço. Em seguida foi adicionado 100µL de LPS/poço (10 µg/mL) (*E. coli*, sorotipo 026:B6, Sigma, USA) e a placa foi incubada em estufa contendo 5% de CO₂, a 37°C durante 48 horas.

Após 48 horas, a placa foi centrifugada a 1500 G durante 4 minutos. 100µl do sobrenadante foi recolhido e transferido para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Griess, sendo a revelação da reação realizada em leitor de microplaca utilizando filtro de 540 nm. Foi feita a curva padrão de 200µM a 6µM, utilizando nitrito de sódio, com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al., 1995; HRUBY et al., 1997). A leitura da absorbância foi feita em aparelho de ELISA (SALTZMAN, 1954).

3.15. Ensaios imunológicos

As dosagens das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β foram realizadas no soro das ratas prenhas, através de ensaios imunoenzimáticos, utilizando Kits de ELISA (Quantikine Rat Interleukin Immunoassay Kit - R&D Systems, INC, USA).

Estes ensaios empregam a técnica quantitativa de ELISA sanduíche.

Os Kits contêm microplacas de ELISA de 96 poços, sensibilizadas com anticorpo específico para cada citocina. Os padrões (de concentrações conhecidas), controles e amostras de soro das fêmeas prenhas foram pipetados para os poços da placa - a citocina presente se liga ao anticorpo. Após várias lavagens para retirar substâncias não ligadas, o anticorpo policlonal ligado a enzima, específico para a citocina de rato, foi adicionado aos poços. Após várias lavagens com tampão específico, a solução do substrato da enzima (H_2O_2 - peróxido de hidrogênio) e o reagente de cor (TMB - tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços da placa. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionada a solução de parada (solução de ácido clorídrico). A reação enzimática produz um produto azul que se torna amarelo após adição da solução de parada. As densidades ópticas foram lidas em leitor de ELISA (Teccan, modelo Sunrise - μ Quant) em comprimento de onda de 450 nm. A intensidade de cor medida é proporcional a quantidade de citocina ligada no início da reação.

Todas as mostras e padrões foram avaliados em duplicata no mesmo ensaio.

O cálculo das concentrações das citocinas (pg/mL) foi obtido utilizando o programa de computador Magellan®.

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

3.16. Análise das populações celulares por citometria de fluxo

Para a interpretação das alterações nas populações celulares foi feita a marcação com posterior leitura em citômetro de fluxo. As células foram extraídas do tecido esplênico e filtradas em *cell strainer* (40 μ), maceradas em meio RPMI 1640 para produção de uma suspensão homogênea. A partir dessa suspensão, 2×10^6 células de cada órgão, de cada grupo experimental, foram colocadas em placas de 96 poços de fundo redondo para análise por citometria de fluxo. Após adição de Fc block (para bloquear ligações inespecíficas), as células foram incubadas com combinações de anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, fluoresceinisotiocianato (FITC), anti-CD8. As células coradas foram armazenadas para análise em PBS contendo 0,01 M de azida de sódio e 1% de paraformaldeído, com a leitura feita no escuro. A análise foi realizada em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan com software DIVA-BD (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

3.17. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph Pad PRISM® 4.0 (Graph Pad, USA).

Os dados com distribuição considerada normal foram analisados utilizando ANOVA seguido do teste de Bonferroni e os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

Os dados em que a distribuição não foi Gaussiana utilizou-se os testes de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis seguida por comparação múltipla de Dunn (para três ou mais grupos).

Em todas as análises, as diferenças observadas foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Parasitemia

A Figura 1 mostra o número de parasitas/mL de sangue nos grupos infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (8º e 15º dia de infecção).

A administração de Se reduziu a parasitemia das fêmeas prenhas infectadas quando comparada ao grupo das prenhas infectadas não tratadas, embora esta redução não tenha sido estatisticamente significativa.

Figura 1. Número de parasitas/mL de sangue nos animais infectados i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI - 8º dia de infecção), fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS - 8º dia de infecção), fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI - 15º dia de infecção), fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS - 15º dia de infecção). $U=5,0$; $H_0 = H_1$; $^+$ média.

4.2. Resultados Morfológicos

4.2.1. Número Total de Fetos/Placentas nos Diferentes Grupos Experimentais

A Tabela 2 mostra, nos diferentes grupos experimentais, o número total de fetos/placentas das ratas Wistar prenhas analisadas.

Tabela 2. Número total de fetos/placentas das fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS).

Grupos experimentais	Número total de fetos/placentas
PC	50
PCS	54
PI	46
PIS	47
Total	197

Não foi observada diferença significativa no número total de fetos entre os diferentes grupos analisados.

Nenhum animal morreu no decorrer dos experimentos.

4.2.2. Peso do Coração das Fêmeas Prenhas Controles e Infectadas

A Figura 2 mostra a distribuição dos pesos cardíacos das fêmeas prenhas nos grupos analisados.

Figura 2. Pesos cardíacos nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS). $H_0=H_1$; $^+$ média.

Não houve alteração estatisticamente significativa nos grupos tratados com Se quando comparados com os grupos sem tratamento.

4.2.3. Peso da Placenta

Os pesos das placentas nos diferentes grupos analisados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Peso das placentas nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS); $H_0 \neq H_1$; $^+$ média; * $p < 0,05$ (PC vs PI; PC vs PIS; PCS vs PIS e PI vs PIS).

O grupo infectado e tratado com selênio (PIS) apresentou um aumento estatisticamente significativo no peso das placentas quando comparado ao grupo sem tratamento (PI).

4.2.4. Diâmetro da Placenta

Os diâmetros das placentas das ratas controles e infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Diâmetro das placentas das ratas controles e infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi* (15º dia de infecção e 18º da prenhez), nos seguintes grupos experimentais: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS). $H_0 \neq H_1$; +média; * $p < 0,05$ (PC vs PI; PCS vs PI; PI vs PIS).

O tratamento com selênio ocasionou um aumento no diâmetro das placentas do grupo infectado quando comparado ao grupo infectado não tratado.

4.2.5. Peso dos Fetos

A Figura 5 apresenta os pesos fetais dos diferentes grupos experimentais.

Figura 5. Peso dos fetos nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS); $H_0 \neq H_1$; +média; * $p < 0,05$ (PC vs PI e PI vs PIS).

A administração de selênio ocasionou um aumento significativo no peso dos fetos quando comparados os grupos PI e PIS.

4.2.6. Comprimento dos Fetos

A Figura 6 mostra o comprimento dos fetos dos grupos PC, PCS, PI e PIS.

Figura 6. Comprimento dos fetos nos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS); $H_0 \neq H_1$; + média; * $p < 0,05$ (PC vs PI; PC vs PIS; PCS vs PI; PCS vs PIS e PI vs PIS).

A administração de selênio ocasionou um aumento significativo no comprimento dos fetos do grupo infectado e tratado.

4.3. Contagem de Macrófagos

A Figura 7 mostra a contagem global de macrófagos peritoneais nos diferentes grupos analisados.

Figura 7. Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mL dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

O número de macrófagos peritoneais, no grupo infectado sem tratamento (PI), foi mais elevado em relação ao grupo não infectado (PC), resultado esperado já que se trata de infecção aguda. No entanto, a administração de Se não interferiu na quantidade das células analisadas quando comparado com o grupo sem tratamento.

4.4. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A Figura 8 mostra as concentrações de nitrito (μM) a partir de células peritoneais sem ou com estimulação com LPS, coletadas dos diferentes grupos experimentais.

Sem LPS - não ocorreu diferença significativa entre os grupos analisados, ou seja, a administração de selênio não alterou a produção de NO nas células peritoneais sem estimulação.

Com LPS - ocorreu um discreto aumento de NO nos grupos tratados com selênio, embora tal diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Figura 8. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais sem ou com estimulação com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas dos diferentes grupos experimentais analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, $n=5$ animais / grupo.

4.5. Resultados da Citometria - Análise das Populações Celulares

4.5.1. Células NK

A Figura 9 mostra a análise fenotípica de células CD161⁺ (NK) no baço de ratas Wistar prenhas controles e infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*.

Figura 9. Análise fenotípica de CD161⁺ (células NK) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS), Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

A administração de Se não ocasionou diferença significativa entre os grupos infectados tratados ou não. No entanto, entre os grupos infectados e controles houve um aumento estatisticamente significativo de células NK ($p < 0.05$).

4.5.2. Células T CD3⁺CD4⁺

A porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ dos diferentes grupos experimentais estudados estão apresentadas na Figura 10.

Figura 10. Análise fenotípica de CD4⁺ (células T CD3⁺CD4⁺) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

A administração de Se não ocasionou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, no entanto pode-se notar uma redução na porcentagem das células T CD3⁺ CD4⁺ no grupo PIS.

4.5.3. Células T CD3⁺ CD8⁺

A Figura 11 mostra as populações celulares de células T CD3⁺CD8⁺, nos grupos controles e infectados, tratados ou não com selênio.

Figura 11. Análise fenotípica de CD8⁺ (células T CD3⁺CD8⁺) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS), * $p < 0,05$. Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, $n=5$ animais / grupo.

O tratamento com selênio não alterou significativamente a porcentagem de células T CD3⁺ CD8⁺, entretanto observa-se uma redução destas células no grupo PIS quando comparado ao grupo PI.

4.5.4. Linfócitos B (CD45⁺)

A Figura 12 apresenta a análise fenotípica de CD45⁺ (células B) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos experimentais.

Figura 12. Análise fenotípica de CD45⁺ (células B) no baço de ratas Wistar dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

O grupo PIS apresentou uma redução na porcentagem de células B, mas tal redução não foi estatisticamente significativa.

4.6. Dosagens de Citocinas

4.6.1. IL- 2

As concentrações de IL-2 estão apresentadas na Figura 13.

Figura 13. Concentrações de IL-2 (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

Praticamente não ocorreu alteração na concentração de IL-2 quando comparado os grupos PI e PIS, com discreta redução no grupo infectado e tratado com Se.

4.6.2. TNF- α

A Figura 14 mostra as concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados.

Figura 14. Concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

O grupo PIS apresentou uma redução na concentração de TNF- α quando comparado ao grupo PI, embora não estatisticamente significativa.

4.6.3. Interferon- γ (IFN- γ)

Na Figura 15 estão expostas as concentrações médias encontradas na dosagem de IFN- γ . Apenas no grupo infectado sem tratamento houve uma maior expressão de IFN- γ , o que indica que talvez a suplementação com Se tenha contribuído para uma menor concentração desta citocina, apesar da diferença não ter sido significativa.

Figura 15. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

4.6.4. IL- 4 e IL-10

Os resultados das dosagens das interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10) nos soros das fêmeas prenhas controles e infectadas, tratadas ou não, foram abaixo do menor valor da concentração da curva padrão, mostrando níveis muito baixos em todos os grupos experimentais estudados. As dosagens foram repetidas e estes resultados foram confirmados.

4.6.5. TGF- β

A figura abaixo apresenta as concentrações de TGF- β (pg/mL) determinadas no soro das ratas prenhas controles e infectadas por *T. cruzi*.

Figura 16. Concentrações de TGF- β (pg/mL) determinadas no soro dos diferentes grupos analisados: Fêmeas prenhas não infectadas e sem tratamento (PC), Fêmeas prenhas não infectadas e tratadas com selênio (PCS), Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi* no 15º dia de infecção, sem tratamento (PI) Fêmeas prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas de cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, tratadas com selênio (PIS). Os resultados do gráfico são expressos em média $\pm$ d.p.m, n=5 animais / grupo.

Não ocorreu diferença significativa entre os grupos analisados.

4.7. Resultados Histológicos

4.7.1. Parasitismo Placentário

A Figura 17 mostra o número de ninhos de amastigotas nos cortes histológicos das placentas dos grupos infectado (PI) e infectado tratado com selênio (PIS).

Figura 17. Número de ninhos de amastigota observados nos cortes histológicos das placentas dos grupos infectados, no 15º dia de infecção, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS); $H_0 \neq H_1$; +média; * $p < 0,05$.

O número de ninhos de amastigotas no grupo infectado e tratado com Se foi muito elevado em comparação ao não tratado, o que demonstra que esse elemento contribuiu para o aumento do parasitismo nas placentas das ratas Wistar.

4.7.2. Histologia da Placenta

4.7.2.1. Grupo Controle

Figura 18. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas sem infecção (PC). A. Visão panorâmica de todas as regiões da placenta (100x). B. Camada decídua (400x). C. Camada esponjosa (400x). D. Região Labiríntica (400x). Hematoxilina-eosina.

4.7.2.2. Grupos Infectados

A Figura 19 mostra as fotomicrografias dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), 15º dia de infecção. O exame dos cortes histológicos das placentas deste grupo mostrou predominância de ninhos de amastigotas na região decídua.

As Figuras 20, 21, 22 e 23 mostram o parasitismo tecidual e o aspecto histológico das placentas dos animais infectados e tratados com selênio (PIS). O exame histológico apresentou acentuado aumento no número de ninhos de amastigotas nas diferentes regiões da placenta – decídua, esponjosa e labiríntica.

4.7.2.2.1. Grupo Infectado sem Tratamento (PI)

Figura 19. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI), 15° dia de infecção. A. Presença de pequeno ninho na placenta. B. Ninho de tamanho médio na região decídua. C. Presença de ninho em uma célula gigante. D. Ninho de amastigota. E. Presença de pequeno ninho de amastigota (400x). F. Mesma figura anterior no aumento de 1000x. Hematoxilina-eosina (400x).

4.7.2.2.2. Grupo Infectado Tratado com Selênio (PIS)

Figura 20. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Ninho grande na camada decídua (100x). B. Ninho de amastigota também na camada decídua (400x). C. Presença de dois ninhos na camada decídua (400x). Hematoxilina-eosina.

Figura 21. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15° dia de infecção. A, B, C e D - Ninhos de amastigotas presentes nas células gigantes (400x). Hematoxilina-eosina.

Figura 22. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Ninho grande de amastigota na região labiríntica visível no menor aumento (100x). B. Figura anterior (400x). C. Ninho de amastigota na região labiríntica (400x). Hematoxilina-eosina.

Figura 23. Fotomicrografia dos cortes histológicos das placentas de ratas Wistar prenhas infectadas i.p. com $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Intenso parasitismo com presença de amastigotas na região labiríntica (400x). B e C. Ninhos de amastigota na região labiríntica (400x e 1000x, respectivamente). Hematoxilina-eosina.

4.7.3. Parasitismo Cardíaco

A Figura 24 mostra o número de ninhos de amastigotas nos cortes histológicos dos corações dos grupos infectado (PI) e infectado tratado com selênio (PIS).

Figura 24. Ninhos de amastigota observados nos cortes histológicos do coração dos grupos infectados i.p. com $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, no 15º dia de infecção, nos seguintes grupos: Fêmeas prenhas infectadas sem tratamento (PI), Fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS). $H_0=H_1$; +média.

A comparação entre os grupos infectado sem tratamento (PI) e infectado tratado com selênio (PIS) não mostrou diferença estatisticamente significativa.

4.7.4. Histologia do Coração

4.7.4.1. Grupo Controle (PC)

Figura 25. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas não infectadas e sem tratamento (PC). A e B. Aspecto histológico do tecido cardíaco (400x). Hematoxilina-eosina.

4.7.4.2. Grupos Infectados

O aspecto histológico do coração das fêmeas prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* sem tratamento (PI) está apresentado na Figura 26. O tecido cardíaco apresentou menor parasitismo que o tecido placentário, com ninhos de amastigotas de tamanhos variados e presença de infiltrado inflamatório.

A Figura 27 mostra os cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas infectadas e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. O aspecto histológico e o parasitismo tecidual foram semelhantes ao grupo sem tratamento.

4.7.4.2.1. Grupo Infectado sem Tratamento (PI)

Figura 26. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas infectadas sem tratamento (PI), 15º dia de infecção, mostrando pequeno ninho de amastigota (A) e um ninho de maior tamanho (B). Hematoxilina-eosina (400x).

4.7.4.2.2. Grupo Infectado e Tratado com Selênio (PIS)

Figura 27. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e tratadas com selênio (PIS), 15º dia de infecção. A. Pequeno ninho de amastigotas no coração. B. Ninho de amastigotas de tamanho maior, com células inflamatórias ao redor. Hematoxilina-eosina (400x).

4.7.5. Histologia dos fetos

Não foram observados ninhos de amastigotas nos cortes histológicos dos fetos provenientes das fêmeas infectadas sem tratamento (PI) e nos fetos das fêmeas infectadas tratadas com selênio (PIS).

Os resultados da administração de Se estão resumidos no fluxograma a seguir:

Figura 28. Fluxograma que resume os resultados da administração de selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste projeto avaliamos o possível efeito imunomodulador do selênio durante a infecção experimental por *T. cruzi*, bem como determinamos os parâmetros imunológicos durante o período gestacional em fêmeas prenhas infectadas e submetidas à terapia com este elemento.

CARLIER et al. (2011) relataram que a transmissão congênita de *T. cruzi* não pode ser prevenida através do tratamento da gestante, uma vez que o arsenal terapêutico disponível possui teratogenicidade conhecida, o que torna importante a busca de alternativas terapêuticas. Durante a gestação é conhecido o aumento da parasitemia quando comparado às mulheres não grávidas infectadas (SIRIANO et al., 2011). O mecanismo desse aumento não é bem compreendido, sendo relatada a participação de fatores imunológicos, como a diminuição na produção de IFN- γ .

Diferentemente de outras proto-parasitoses, a transmissão congênita de *T. cruzi* pode ocorrer tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença; no entanto, a maioria dos casos descritos ocorreu na fase crônica, em que as mães foram infectadas na infância (CARLIER et al., 2013). Nas Américas existem aproximadamente dois milhões de mulheres infectadas que estão em idade fértil; a migração de pessoas, principalmente nas últimas décadas, foi responsável pela transmissão da doença em áreas não endêmicas (CARLIER et al., 2013).

A doença de Chagas é geradora de grande estresse oxidativo que é definido como o desequilíbrio entre pró e antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio (EROs), frutos deste desequilíbrio, são substâncias com um ou mais elétrons desemparelhados que, por causa disso, são altamente reativos e interagem com lipídios, proteínas ou DNA, levando à oxidação e mau funcionamento celular (POSTON et al., 2011).

Sabe-se que os EROs são responsáveis por uma série de alterações que contribuem para a diminuição da capacidade reprodutiva, aborto, má formações e pré-eclâmpsia (BERTI et al., 2011; POSTON et al., 2011). A produção excessiva de EROs pode prejudicar a maturação do oócito, podendo limitar o sucesso da ovulação e fertilização (POSTON et al., 2011).

Os micronutrientes, como o selênio, estão envolvidos em todos os estágios do desenvolvimento embrionário e diferenciação tecidual, incluindo a sinalização celular, produção de proteínas, sendo a chave da estrutura de muitas enzimas e estruturas celulares; os minerais, em especial, possuem funções centrais na ação catalítica de certas enzimas e na estabilização de fatores de transcrição (ASHWORTH et al., 2001).

O selênio é um mineral essencial na alimentação humana, sendo encontrado tanto no solo quanto na água e, conseqüentemente, é incorporado à alimentação através do consumo de plantas e organismos aquáticos. Algumas áreas do globo têm solo pobre em selênio, causando desordens ósseas e cardíacas, que são corrigíveis com a suplementação (WEEKS et al., 2012). O Se é incorporado às selenoproteínas, como o grupo das glutathione peroxidases (GPx), que possuem função vital no organismo, sendo antioxidantes essenciais na luta contra o câncer e outras desordens (WEEKS et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que as fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio apresentaram redução do número de parasitas circulantes no 8º dia da infecção (pico de parasitemia). Diversos trabalhos corroboram com os nossos resultados. DAVIS et al. (1998) relataram que a adição de selenato de sódio (4 e 16 ppm) na água de beber diminuía a parasitemia e a mortalidade de camundongos C3H infectados pela cepa Brasil de *T. cruzi*. Da mesma forma, SOUZA et al. (2003), utilizando as mesmas concentrações de selênio, também observaram redução da parasitemia de camundongos Swiss infectados pela cepa Y de *T. cruzi* no 8º dia após a infecção, sendo a redução significativa apenas na dose de 16 ppm de selênio. Muitos estudos clínicos fazem relação entre a deficiência plasmática de selênio com piora no prognóstico da doença de Chagas e de outras doenças tropicais, como a leishmaniose (ESPUELAS et al., 2012).

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram a redução significativa da parasitemia, em ratos infectados com *T. cruzi*, após administração de outros elementos, tais como o zinco (BRAZÃO et al., 2008; DA COSTA et al., 2013). BRAZÃO et al. (2010) verificaram que a suplementação com zinco e/ou DHEA estimulava a resposta imune, causando uma redução significativa da parasitemia em ratos Wistar machos. DA COSTA et al. (2014) também

observaram diminuição da parasitemia em ratas Wistar prenhas infectadas e suplementadas com L-arginina.

Nossos resultados mostraram que as lesões cardíacas dos animais infectados tratados com Se foram semelhantes às dos animais infectados sem tratamento. No entanto, DE SOUZA et al. (2003) mostraram que a suplementação com selênio contribuiu para atenuar o dano no músculo cardíaco em camundongos infectados por *T. cruzi* e reduziu a mortalidade destes animais (DAVIS et al., 1998). Também foi demonstrada uma maior susceptibilidade à doença na deficiência desse mineral (DE SOUZA et al., 2002).

Em relação aos pesos cardíacos, as ratas prenhas infectadas e tratadas com Se, na fase aguda da infecção, também não apresentaram diferenças significantes quando comparadas ao grupo sem tratamento.

Deficiência de Se já foi relacionada com aumento da gravidade da miopatia em camundongos cronicamente infectados (JELICKS et al. 2011). A suplementação com selênio, além de prevenir a extrema dilatação do ventrículo esquerdo, em camundongos cronicamente infectados (marcador de severidade da doença), também foi capaz de reverter alterações no eletrocardiograma e na inflamação do pericárdio, próximo ao nó atrioventricular, demonstrando os benefícios da suplementação com Se, em camundongos na fase crônica da infecção (JELICKS et al., 2011). Entretanto, no presente projeto, a administração de selênio às ratas prenhas, na fase aguda da infecção, não demonstrou alteração nos parâmetros cardíacos analisados.

Analisando os dados de peso e diâmetro placentários, peso e comprimento fetais, ficou evidente a influência do selênio nesses parâmetros. Nestes casos obtivemos diferenças significantes, indicando que a suplementação com selênio contribuiu de forma positiva no desenvolvimento fetal de ratas Wistar frente à infecção pela cepa Y de *T. cruzi*.

Sabe-se que a deficiência de selênio está associada com infertilidade e aborto espontâneo, o que sugere que proteínas que contenham este elemento são essenciais no desenvolvimento embrionário (KINGSLEY et al., 1998). MISTRY et al. (2008) relataram em seu estudo, que na gestação há um aumento no estresse

oxidativo, com redução nos níveis de GPx, que está associado com redução nos níveis de selênio, o que aumentaria a quantidade de peróxidos lipídicos tóxicos na placenta, contribuindo para uma disfunção endotelial e hipertensão.

O selênio é importante no desenvolvimento embrionário após a implantação do embrião e no desenvolvimento e funcionamento de órgãos fetais e neonatais (ASHWORTH et al., 2001). ARNAUD et al. (1994) confirmaram os dados encontrados, relatando que a deficiência de selênio está associado não apenas com abortos, mas também com crescimento fetal prejudicado. Nossos resultados mostraram que a administração de Se foi benéfica no desenvolvimento dos fetos das ratas.

Na contagem de macrófagos não houve diferença entre os grupos infectados, sendo maior quando comparado aos grupos controles (PC e PCS), um aumento natural expresso em infecções. Macrófagos são importantes na produção de NO, molécula tripanocida que exerce um importante papel na resposta contra o parasita. Essas células também são produtoras do fator de inibição de migração (MIF - migration inhibitory factor), uma citocina pleiotrópica, chave na modulação da resposta imune protetora contra bactérias e protozoários que aumenta a produção de TNF- α , com aumento na atividade microbicida dos macrófagos (REYES et al., 2006). As dosagens de NO também não sofreram mudanças com a administração de selênio, independente da estimulação ou não com LPS.

Vários estudos têm demonstrado a participação de células natural killer (NK), linfócitos T auxiliares (CD4⁺), anticorpos secretados por linfócitos B e a expansão de clones de células T citotóxicas (CD8⁺) durante a infecção experimental por *T. cruzi*, e sua importância na defesa do hospedeiro. Autores evidenciaram que a depleção seletiva de células CD4⁺ ou CD8⁺ (ROTTENBERG et al., 1995), ou de ambas (ROFT et al., 2000), bem como de células B ou de diferentes citocinas, em animais infectados, resulta no desenvolvimento de intenso parasitismo, com consequente morte dos animais. O agente causador da doença de Chagas provoca alterações nas populações de células do sistema imunológico e dos órgãos linfoides; isso pode resultar em esplenomegalia, atrofia tímica e ativação policlonal, tanto de células T quanto de células B (HENRIQUES-PONS et al., 2005; LEITE-DE-MORAES et al., 1992; MINOPRIO et al., 1986).

Em relação à atuação das células NK na resposta imune, KIREMIDJIAN-SCHUMACHER et al. (1996) mostraram o efeito benéfico da suplementação com selênio sobre a função imunológica, incluindo o aumento da resistência do hospedeiro devido a elevação da atividade lítica de células NK na expressão de IL-2R e resposta mitogênica. Em nosso experimento, a avaliação da sub-população de células NK (CD-161) não revelou alterações significantes para o grupo de animais tratados com selênio.

LIEKE et al. (2004) também observaram a importância das células NK durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi*, exibindo uma atividade antiparasitária contato-dependente contra parasitas extracelulares, limitando a ação de tripomastigotas circulantes. VITELLI-AVELAR et al. (2006) e SATHLER-AVELAR et al. (2013) sugerem que na ativação da resposta imunológica durante a doença de Chagas, quando ocorre o recrutamento de células NK e ativação de monócitos, seria um estágio de transição que interliga a resposta imune inata com a adaptativa no controle da infecção.

Em relação às células T $CD3^+CD4^+$, não houve diferenças significativas entre os grupos infectados. Da mesma forma, a porcentagem de células T $CD3^+CD8^+$, comparando os grupos infectados tratado (PIS) e não tratado (PI), não ocorreram alterações, mas quando comparado os grupos não infectado e infectado, observamos uma quantidade maior de células citotóxicas nos grupos infectados. ROSENBERG et al. (2010) reforçam a importância desse tipo celular no controle da infecção aguda por *T. cruzi*, que também é observado na infecção chagásica crônica (NICOLAS et al., 2011).

CHENG et al. (2012) relataram que a suplementação com Se foi capaz de regular células B periféricas de camundongos. No entanto, em nosso estudo, a suplementação com selênio não interferiu significativamente na população de células B dos grupos analisados. Mesmo não sendo significativa, a redução das populações celulares (T $CD3^+CD4^+$, T $CD3^+CD8^+$ e células B) pode ter ocasionado uma somatória de eventos favoráveis à infecção.

Sabe-se que as células T auxiliaadoras ($CD4^+$) exercem ação protetora na infecção chagásica mediada pela produção de IFN- γ , tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SANOJA et al., 2013). IFN- γ é um importante mediador na resistência contra *T.*

cruzi, regula a expressão de uma variedade de genes, incluindo citocinas e receptores de citocinas (RODRIGUES et al., 2012).

No início da infecção IFN- γ também é secretado por outros tipos celulares como células NK, fazendo parte da resposta imune inata. Posteriormente com o decorrer da infecção, sua ativação ocorre através de células T CD4⁺ e CD8⁺ (RODRIGUES et al., 2012). O Se pode ter contribuído para uma menor expressão de IFN- γ , embora a redução não tenha sido estatisticamente significativa.

WAGHABI et al. (2009) analisaram os efeitos de TGF- β , inibindo a sinalização dessa citocina através de um fármaco administrado por via oral, na fase aguda da doença de Chagas em camundongos Swiss. Esse tratamento diminuiu a mortalidade, parasitemia e lesão cardíaca, o que evidencia a importância dessa citocina na infecção. Nossos resultados mostraram que o Se não interferiu nos níveis de TGF- β dos animais infectados e tratados.

Analisando as concentrações de TNF- α , observamos uma diminuição nos animais infectados e tratados com selênio, mostrando que o selênio pode também ter interferido nesta citocina. O controle da infecção em humanos é dependente da produção de TNF- α , inclusive influenciando na migração de células T periféricas, mas sua elevação pode contribuir na patologia da doença no hospedeiro; TNF- α também está associado com uma ação secundária na ativação de macrófagos, agindo como sinalização secundária para produção de óxido nítrico (PÉREZ et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012). A redução de TNF- α nos grupos suplementados com selênio também pode ter contribuído para o aumento de ninhinhos de amastigotas nas placentas das ratas.

Os animais suplementados com Se apresentaram elevado número de ninhinhos de amastigotas nas placentas. A comparação das quantidades de ninhinhos no coração dos animais infectados e tratados (PIS) com o grupo sem tratamento (PI), não mostrou diferença significativa, comprovando que o aumento do parasitismo foi específico no tecido placentário.

Várias teorias podem ser discutidas na tentativa de explicar a presença maciça de parasitas na placenta. ABBASI et al. (2003) mostraram a invasão e

multiplicação de outro parasita, o *Toxoplasma gondi*, nas células placentárias, relatando que o mecanismo de invasão nestas células é pouco conhecido.

MCCARTHY & DAVIS (2003) mostraram que a suplementação aumentada de vitamina E com selênio, na dieta de camundongos infectados com *T. gondii*, levou a um aumento no número de cistos teciduais nos animais. Alguns autores relatam que a resposta Th1 comporta-se como um mecanismo eficiente frente à infecção por *T. gondii*, principalmente governado pela maior produção de citocinas tais como IFN- γ (ABBASI, 2003; YAP, 2000).

GANGNEUX et al. (2011) relataram que o equilíbrio imunológico durante a prenhez é importante na proteção do feto, porém encontra-se reduzido em consequência à tolerância materno-fetal. Todos estes dados, descritos anteriormente, podem indiretamente explicar o intenso parasitismo tecidual. Em mulheres, a concentração de selênio nas membranas placentárias, líquido amniótico e fetos são bem maiores que o selênio sérico materno, o que sugere um mecanismo de transporte ativo bastante eficaz através da placenta (KILINK et al., 2010). Dessa forma, níveis mais elevados de selênio provavelmente favoreceram a migração de *T. cruzi* para o tecido placentário, elevando significativamente o número de ninhos de amastigotas nos animais suplementados com este micronutriente.

BEHNE et al. (1988) analisaram proteínas contendo Se em tecidos alvo específicos, verificando maior concentração deste elemento nos órgãos reprodutores e endócrinos, sugerindo funções biológicas importantes destas selenoproteínas, principalmente nesses tecidos. Neste estudo, os autores verificaram que a concentração de proteínas contendo selênio era bem maior no ovário/corpo lúteo de ratas Wistar do que no tecido cardíaco do grupo suplementado com selênio. Estes achados podem indicar a influência do Se no maior parasitismo da placenta em relação ao coração, devido à diferença de concentração de Se nesses tecidos.

No entanto, apesar do intenso parasitismo placentário não foram observados ninhos de amastigotas nos cortes histológicos dos fetos do grupo infectado e tratado com Se. A atividade fagocitária da placenta é um dos elementos que não permitem a transmissão transplacentária do parasita (MOR et al., 2003; SOUTHCORBE et al., 2011; KIM et al., 2012). Além disso, a resposta imune placentária também é importante no controle da transmissão congênita do parasita (CARLIER, 2005).

O balanço imunológico durante a gravidez é bastante variado, já que o equilíbrio entre a proteção parasitária (resposta imunológica padrão Th1) e a tolerância materno-fetal (padrão Th2) é bem delicado.

Nas infecções parasitárias em geral, ocorre a indução e a expressão de Tregs, um subconjunto de células T, definidas como células com atividade reguladora da resposta imune (célula T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺). Parasitas têm a capacidade de manipular Tregs no local da infecção, permanecendo assim no hospedeiro por mais tempo (VELAVAN et al., 2011; HANEL et al., 2011; BACCHETTA et al., 2007).

DIMOVA et al. (2011) observaram um exclusivo acúmulo decidual de células T regulatórias naïve CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺, funcionando como um reservatório de células prontas para serem ativadas em clássicas Treg no útero, exercendo sua função na homeostasia. A perda de embriões em ratos infectados com *Toxoplasma gondii*, por exemplo, pode estar associada com uma proporção reduzida de Tregs (ZHANG et al., 2012).

A gravidez é um estado fisiológico acompanhado por uma alta demanda metabólica e altos níveis de oxigênio; além disso, a placenta sofre grande estresse oxidativo porque é rica em ácidos poli-insaturados, que são passíveis de sofrerem oxidação, o que exige uma maior demanda do sistema antioxidante, o que poderia aumentar os efeitos da GPx nesse tecido (CHEN et al., 2012). Em comparação ao presente trabalho, SALES-JUNIOR et al. (2008) também não observaram diferenças histológicas no tecido cardíaco, onde foi inativado células CD 25⁺, receptor expresso em Tregs.

Portanto, a diminuição encontrada de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF- α e IFN- γ); a redução das populações celulares (T CD3⁺CD4⁺, T CD3⁺CD8⁺ e células B) e uma resposta voltada à um padrão Th2, característico da gestação, são as prováveis causas do aumento da susceptibilidade encontrada nos animais tratados com selênio.

São conhecidos os efeitos teratogênicos da medicação disponível no combate ao *T. cruzi*, sendo importante a busca por novas propostas terapêuticas sem risco para o feto. A compreensão de como o Se interage com os diferentes tipos

de tecidos também é necessária, visto que este microelemento pode ter ações distintas no organismo. Assim, é possível que a administração de Se, durante a prenhez, poderia alterar a resposta imune placentária local, favorecendo a instalação do parasita.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente projeto permitem concluir os seguintes aspectos:

- ✓ O tratamento com selênio interferiu no desenvolvimento dos fetos das ratas Wistar infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*, causando aumento no peso e comprimento dos fetos, bem como de suas placentas.
- ✓ A parasitemia sanguínea das ratas prenhas infectadas e tratadas com selênio mostrou-se reduzida.
- ✓ As populações de células T CD3⁺CD4⁺, T CD3⁺CD8⁺ e linfócitos B apresentaram redução nas ratas infectadas e tratadas com selênio, embora não estatisticamente significativa.
- ✓ As concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-2 no soro das fêmeas prenhas infectadas e tratadas com selênio estavam reduzidas, no entanto a redução não foi estatisticamente significativa.
- ✓ A produção de óxido nítrico não mostrou alteração significativa no grupo infectado e tratado quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.
- ✓ O tratamento com selênio proporcionou um aumento do parasitismo placentário, com elevado número de ninhos de amastigotas em todas as regiões da placenta.
- ✓ No entanto, o aspecto histológico do coração e o parasitismo cardíaco das ratas infectadas e tratadas com selênio foram semelhantes ao grupo infectado sem tratamento.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J.; Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Disease**, v. 188, p. 608-16. 2003.

ALONSO-VEGA, C.; HERMANN, E.; TRUYENS, C.; RODRÍGUEZ, P.; TORRICO, M. C.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. Immunological status of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 101-4, 2005.

ANAN, Y.; OGRA, Y. Effects of chemical species of selenium on maternal transfer during pregnancy and lactation. **Life Sciences**, v. 84, n. 25-6, p. 888-93, 2009.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do recôncavo baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Revista de Patologia Tropical**, v.3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, A. L.; ZINCKER, F. Chronic malnutrition and *Trypanosoma cruzi* infection in children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 41, p. 112–115, 1995.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819-23, 2005.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v.4, p. 243–253, 2010.

ARAÚJO, A.; JANSEN, A. M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitology of Chagas disease - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 9-16, 2009.

ARNAUD, J.; PREZIOSI, L.; MASHAKO, L.; GALAN, P.; FAVIER, A.; KAPONGO, C.; HERCBERG, S. Serum trace elements in Zairian mothers and their newborns. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, p. 341-8, 1994.

ASHWORTH, C. J.; ANTIPATIS, C. Micronutrient programming of development throughout gestation. **Reproduction**, v. 122, n.4, p. 527-35, 2001.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTIMEERS, E. E. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2034-9, 2004.

BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **The Journal of Allergy and Clinical immunology**, v. 120, n. 2, p. 227-35, 2007.

BECK, M. A; LEVANDER, O. A. Dietary oxidative stress and the potentiation of viral infection. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, p. 93-116, 1998.

BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **The Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 3, p. 455-65, 2005.

BEHNE, D.; HILMERT, H.; SCHEID, S.; GESSNER, H.; ELGER, W. Evidence for specific target tissues and new biologically important selenoproteins. **Biochimica Biophysica**, v. 966, p. 12-21, 1988.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 551-89, 2009.

BENAIM, G.; PANIZ-MONDOLFI, A. E. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, p. 605–9, 2012.

BERTI, C.; BIESALSKI, H. K.; GÄRTNER, R. Micronutrients in pregnancy: current knowledge and unresolved questions. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 689-701, 2011.

BOGDAN, C. The function of nitric oxide in the immune system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 443-92, 2000.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C. T.; MANARIN, R. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1373-84, 2010.

BRAZÃO, V.; CAETANO, L. C.; DEL-VECCHIO, F. M.; TOLDO, M. P. A.; CAETANO, L. N.; DO-PRADO Jr., J. C. Zinc supplementation increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 1-2, p. 32-7, 2008.

BRAZÃO, V.; CAETANO, L. C.; DEL-VECCHIO, F. M.; SANTELLO, F. H.; ALONSO-TOLDO, M. P.; DO-PRADO Jr., J. C. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc supplementation in the immune response during the course of experimental disease. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 1, p. 105-9, 2009.

BRAZÃO, V.; CAETANO, L. C.; DEL-VECCHIO, F. M.; SANTELLO, F. H.; ALONSO-TOLDO, M. P.; DO-PRADO Jr., J. C. Immunomodulatory effects of zinc and DHEA

on the Th-1 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunobiology**, v. 215, n. 5, p. 427-34, 2010.

BRENER, Z. Comparative studies of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 59, n.1, p. 19-25, 1965.

BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 63, p. 215-20, 1969.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASH, A. C.; DI-NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229-36, 2006.

CAMARGOS, E. R. S.; FRANCO, D. J.; GARCIA, C. M. M. G.; DUTRA, A. P.; TEIXEIRA-JUNIOR, A. L.; CHIARI, E.; MACHADO, C. R. S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 604-12, 2000.

CARLIER, Y. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 105-7, 2005.

CARLIER, Y.; TORRICO, F.; SOSA-ESTANI, S.; RUSSOMANDO, G.; LUQUETTI, A.; FREILIJ, H. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. e1250, 2011.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.

CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647-64, 2004.

CASTRO, M. A. P.; BERNER, Z. Estudo parasitológico e anatomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 233-9, 1985.

CHAGAS, C. Nova trypanozomíase humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p.11-80, 1909.

CHEN, Y. C.; TAIN, Y. N.; SHEEN, J. M.; HUANG, L. T. Melatonin utility in neonates and children. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, n. 2, p. 57-66, 2012.

CHENG, W.H.; HOLMSTROM, A.; LI, X.; WU, R. T.; ZENG, H.; XIAO, Z. Effect of dietary selenium and cancer cell xenograft on peripheral T and B lymphocytes in adult nude mice. **Biological Trace Element Research**, v. 146, n. 2, p. 230-5, 2012.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-22, 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, p. 6-7, 2010.

DA COSTA, C. M. B.; BRAZÃO, V.; KUEHN, C. C.; OLIVEIRA, L.G. R.; DO PRADO JÚNIOR, J. C.; SALA, M. A.; ABRAHÃO, A. A. C. Zinc and pregnancy: Marked changes on the immune response following zinc therapy for pregnant females challenged with *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Nutrition**, v. 32, p. 592-8, 2013.

DA COSTA, C. M. B.; DE FREITAS, M. R. B.; BRAZÃO, V.; DOS SANTOS, C.D.; DO PRADO JÚNIOR, J. C.; SALA, M. A.; ABRAHÃO, A. A. C. Does L-arginine availability during the early pregnancy alters the immune response of *Trypanosoma cruzi* infected and pregnant Wistar rats? **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 59-66, 2014.

DAVIS, C. D.; BROOKS, L.; CALISI, C.; BENNETT, B. J.; MCELROY, D. M. Beneficial effect of selenium supplementation during murine infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 6, p.1274-7, 1998.

DE SOUZA, A. P.; DE OLIVEIRA, G. M.; NEVE, J.; VANDERPAS, J.; PIRMEZ, C.; DE CASTRO, S. L.; ARAUJO-JORGE, T. C.; RIVERA, M. T. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. **Experimental Parasitology**, v. 101, p. 193-9, 2002.

DE SOUZA, A. P.; OLIVEIRA, G. M.; VANDERPAS, J.; CASTRO, S. L.; RIVERA, M. T.; ARAÚJO-JORGE, T. C. Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 91, p. 51-4, 2003.

DE SOUZA, A. P.; SIEBERG, R.; Li, H.; CAHILL, H. R.; ZHAO, D. Z.; ARAUJO-JORGE, T. C.; TANOWITZ, H. B.; JELICKS, L. A., The role of selenium in intestinal motility and morphology in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1293-8, 2010.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p.1-18, 2010.

DIAS, E. *Trypanosoma cruzi* ou *Schizotrypanum cruzi*? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.29, n.10, p. 203-27, 1934.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Emmanuel Dias and *Trypanosoma cruzi* discovery: two centenaries to celebrate editorial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 415-6, 2008.

DIMOVA, T. Maternal Foxp3 expressing CD4⁺ CD25⁺ and CD4⁺ CD25⁻ regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 44-56, 2011.

DOS REIS, G. A. etiological agent of Chagas disease: evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 84-90, 2011.

ESPUELAS, S.; PLANO, D.; NGUEWA, P.; FONT, M.; PALOP, J. A.; IRACHE, J. M.; SANMARTÍN, C. Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4259-88, 2012.

FERNANDEZ-AGUILAR, S.; LAMBOT, M. A.; TORRICO, F.; ALONSO-VEJA, C.; CÓRDOBA, M.; SUÁREZ, E.; NOEL, J. C.; CARLIER, Y. Placental lesions in human *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 84-6, 2005.

FERRER, E.; ALEGRIA, A.; BARBERA, R.; FARRE, R.; LAGARDA, M. J.; MONLEON, J. Whole blood selenium content in pregnant women. **The Science of the Total Environment**, v. 227, p. 139–43, 1999.

GARZONI, L. R.; MASUDA, M. O.; CAPELLA, M. M.; LOPES, A. G.; DE-MEIRELLES, M. Characterization of $[Ca^{2+}]_i$ responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 487-93, 2003.

GOMEZ, R. M.; SOLANA, M. E.; LEVANDER, O. A. Host selenium deficiency increases the severity of chronic inflammatory myopathy in *Trypanosoma cruzi*-inoculated mice. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 541–547, 2002.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 236-45, 2009.

HANEL, S. A.; VELAVAN, T. P.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population. **Immunogenetics**, v. 63, n. 7, p. 409-15, 2011.

HATFIELD D. L.; CARLSON B. A.; XU, X.; MIX, [H.](#); GLADYSHEV, V. N. Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in

development and health. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 81, p. 97-142, 2006.

HENRIQUES-PONS, A.; OLIVIERI, B. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* increases the population of CD8⁺, but not CD4⁺, immunoglobulin G Fc receptor-positive T Lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5048-52, 2005.

HERMANN, E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 7, p. 1274-81, 2004.

HRUBÝ, K.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZENBACHER, P.; NOBILIS, M. Potential cancerostatic benfluron is metabolized by peroxidase: in vitro biotransformation of benfluron by horseradish peroxidase. **General Physiology and Biophysics**, v.16, n. 4, p. 321-7, 1997.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, p.145- 96, 2003.

JACKSON, Y.; MYERS, C.; DIANA, A.; MARTI, H. P.; WOLFF, H.; CHAPPUIS, F.; LOUTAN, L.; GERVAIX, A. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 601-3, 2009.

JELICKS, L. A.; DE-SOUZA, A. P.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; TANOWITZ, H. B. Would selenium supplementation aid in therapy for Chagas disease? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 102-5, 2011.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas disease: a proposal. **Biological Research**, p. 307-16, 2010.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, v. 8, n. 3, p. 223-46, 2003.

KILINC, M. Serum reference levels of selenium, zinc and copper in healthy pregnant women at a prenatal screening program in southeastern Mediterranean region of Turkey. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 24, n. 3, p. 152-6, 2010.

KIM, D. H.; LIJIMA, H.; GOTO, K.; SAKAI, J.; ISHII, H.; SUZUKI, H. Human Apolipoprotein E Receptor 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 14, p. 8373-80, 1996.

KING, J. C. The risk of maternal nutritional depletion and poor outcomes increases in early or closely spaced pregnancies. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1732–36, 2003.

KINGSLEY, P. D.; WHITIN, J. C.; COHEN, H. J.; PALIS, J. Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in

deciduum, visceral yolk sac, and skin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, n. 4, p. 343-55, 1998.

KIRCHHOFF, L. V. Chagas disease (American Trypanosomiasis): a tropical disease now emerging in the United States. **Emerging Infections**, v. 3, p. 111-34, 1999.

KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L.; ROY, M.; WISHE, H. I.; COHEN, M. W.; STOTZKY, G. Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells. **Biological Trace Element Research**, v. 52, p. 227-39, 1996.

LAMBERT, N.; MEHTA, B.; WALTERS, R.; ERON, J. J. Chagasic encephalitis as the initial manifestation of AIDS. **Annals of Internal Medicine**, v.12, p. 941-3, 2006.

LEITE-DE-MORAES, M. C. M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 77, p. 95-8, 1992.

LIEKE, T.; GRAEFE, S. E.; KLAUENBERG, U.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. **Infection and Immunity**, v.72, n. 12, p. 6817-25, 2004.

LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Host-cell attachment by *Trypanosoma cruzi*: identification of an adhesion molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, n. 1, p. 256-62, 1988.

LIN, S.; SARTORI, M. J.; MEZZANO, L.; DE-FABRO, S. P. Placental alkaline phosphatase (PLAP) enzyme activity and binding to IgG in Chagas' disease. **Placenta**, v. 26, n. 10, p. 789-95, 2005.

LOPES, M. F.; VEIGA, V. F.; SANTOS, A. R.; FONSECA, M. E. F.; DOS REIS, G. A. Activation-induced CD4 T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 744-52, 1995.

LOWENSTEIN, C. J.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, p. 227-37, 1994.

MCCARTHY, S.M.; DAVIS, C. D. Prooxidant diet provides protection during murine infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 886-94, 2003.

MACHADO, R. L.; POVOA, M. M.; CALVOSA, V. S.; FERREIRA, M. U.; ROSSIT, A. R.; DOS SANTOS, E. J.; CONWAY, D. J. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the brazilian amazon region. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1547-55, 2004.

MARIANO, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; PAVANELLI, W. R.; MILANEZI, C. M.; CAVASSANI, K. A.; MOREIRA, A. P.; FERREIRA, B. R.; CUNHA, F. Q.; CARDOSO, C, R.; SILVA, J. S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 825-33, 2008.

MAYER, B. Structure and function of nitric oxide synthase. **Biology and Chemistry**, v. 2, p. 390-1, 1998.

MIHAILOVIĆ, M.; CVETKOVIC, M.; LJUBI, A. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. **Biological Trace Element Research**, v. 73, n. 1, p. 47-54, 2000.

MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 287-96, 1995.

MINOPRIO, P. H.; EISEN, L.; FORNI, M. R. D.; LIMA, M.; JOSKOWICZ A.; COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 24, p. 661-8, 1986.

MISTRY, H. D.; WILSON V.; RAMSAY, M. M.; SYMONDS, M. E. Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 881-8, 2008.

MISTRY, H. D. Selenium in reproductive health. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 206, n. 1, p. 21-30, 2012.

MONCAYO, A. Commentary: the lucid reasoning of Carlos Chagas. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 4, p. 695-6, 2008.

MOR, G.; ABRAHAMS, V. M. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 119-26, 2003.

MORENO-REYES R.; SUETENS C.; MATHIEU, F.; BEGAUX, F.; ZHU, D.; RIVERA M. T.; BOELAERT, M.; PERLMUTTER, N.; VANDERPAS, J. Osteoarthropathy in

rural Tibet in relation to selenium and iodine status. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 1112-20, 1998.

MUCCI, J. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1086-95, 2006.

NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F. S; BURLEIGH, B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 634-43, 2012.

NAHREVANIAN, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 440-8, 2009.

NÈVE, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 3, p. 42-7, 1996.

NOGUEIRA, N. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Ciba Foundation Symposium**, v. 99, p. 52-73, 1983.

OLDFIELD, J. E. The two faces of selenium. **The Journal of Nutrition**, v. 117, n. 12, p. 2002-8, 1987.

ORTIZ, S.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. **Acta Tropica**, v. 124, n. 3, p. 243-6, 2012.

PAPP, L. V.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 793-5, 2010.

PASZKOWSKI, T.; TRAUB, A. I.; ROBINSON, S. Y. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. **Clinica Chimica Acta**, v. 236, n. 2, p. 173-80, 1995.

PATRICK, L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 3, p.239-58, 2004.

PÉREZ, A.R.; BERBERT, L.R.; LEPLETIER, A.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental *Trypanosoma cruzi* infection and favors the export of immature cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p.1-10, 2012.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; CHEDRAUI, P. Chagas disease in pregnancy: a non-endemic problem in a globalized world. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 282, n. 6, p. 595-9, 2010.

POSTON, L.; IGOSHEVA, N.; MISTRY, H. D.; SEED, P.T.; SHENNAN, A. H.; RANA, S.; KARUMANCHI, S. A.; CHAPPELL, L. C. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 6, p.1980S-85S, 2011.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 4, p. 219-27, 2001.

RASSI, A.; RASSI-JR, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 203-15, 2002.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L. I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3170-9, 2006.

RIVERA, M. T.; DE-SOUZA, A. P.; MORENO, A. H.; XAVIER, S. S.; GOMES, J. A.; ROCHA, M. O. Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 706-12, 2002.

ROBERT-GANGNEUX, F.; MURAT, J. B.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; GANGNEUX J. P.; PELLOUX H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? **Trends of Parasitology**, v. 12, p. 530-6, 2011.

RODRIGUES, A. A.; SAOSA, J. S.; DA SILVA, G. K.; MARTINS, F. A.; DA SILVA, A. A.; SOUZA NETO, C. P.; HORTA, C. V.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; DA SILVA, C. V. IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1598-1611, 2012.

RODRÍGUEZ, A.; MARTINEZ, I.; CHUNG, A.; BERLOT, C. H.; ANDREWS, N. W. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 16754-9, 1999.

ROSENBERG, C. S.; MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 560-8, 2010.

ROTRUCK, J. T. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, n. 4073, p. 588-90, 1973.

ROTTENBERG, M. E.; SPORRONG, L.; PERSSON, I.; WIGZELL, H.; ORN, A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 164-70,

SALES, P. A.; GOLGHER, D.; OLIVEIRA, R. V.; VIEIRA, V.; ARANTES, R. M. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 6, p. 680-8, 2008.

SALTZMAN, B.E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in atmosphere. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 12, p.1949-55, 1954.

SANOJA, C.; CARBAJOSA, S.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4+ T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-11, 2013.

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

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; ANTAS, P. R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-

CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S. M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 58, p. 655-63, 2003.

SCHMITZ, V.; SVENSIO, E.; SERRA, R. R.; TEIXEIRA, M. M. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 6, p. 1005-14, 2009.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007.

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

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N. R.; CARDOSO, M. A. G.; ALIBERTI, J. C. S.; CUNHA F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon- activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4862-7, 1995.

SIRIANO, L. D. R.; LUGUETTI A. O.; AVELAR, J. B.; MARRA, N. L.; DE-CASTRO, A. M. Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by

hemoculture. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 569-74, 2011.

SMALL-HOWARD, A. L.; BERRY, M. J. Unique features of selenocysteine incorporation function within the context of general eukaryotic translational processes. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 1493-97, 2005.

SOUTHCORBE, J.; TANNETTA, D.; REDMAN, C. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. **PLOS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2011.

TARA, F.; MAAMOURI, G.; RAYMAN, M. P.; GHAYOUR-MOBARHAN, M.; SAHEBKAR, A.; YAZARLU, O.; OULADAN, S.; TAVALLAIE, S.; AZIMI-NEZHAD, M.; SHAKERI, M. T.; BOSKABADI, H.; OLADI, M.; SANGANI, M. T.; RAZAVI, B. S.; FERNS, G. Selenium supplementation and the incidence of preeclampsia in pregnant Iranian women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 49, n. 2, p. 181-7, 2010.

TARDIEUX, B. I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 3, p.1017-22, 1994.

TARDIEUX, I. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117-30, 1992.

TERENZI, F.; DÍAZ-GUERRA, M.J.M.; CASADO, M.; HORTELANO, S.; LEONI S.; BOSCA, L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 6017-21, 1995.

TODESCHINI, A. R.; NUNES, M. P.; PIRES, R. S. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5192-8, 2002.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 443-52, 2007.

UYEMURA, S.A.; ALBUQUERQUE, S.; CURTI, C. Energetics of heart mitochondria during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 11, p. 1183-89, 1995.

VELAVAN, T. P.; OJURONGBE, O. Regulatory T cells and parasites. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2011, p. 520940, 2011.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 119, n. 1, p. 228-35, 1984.

VILLALTA, F.; MADISON, M. N.; KLESHCHENKO, Y. Y.; NDE, P. N.; LIMA, M. F. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 10, p. 3714-34, 2008.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; MASSARA, R.L.; BORGES, J.D.; LAGE, P. S.; LANA, M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DIAS, J. C.; ELÓI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25 High T cells

balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity?

Clinical and Experimental Immunology, v. 145, p. 81-92, 2006.

XU, G. L.; WANG, S. C.; GU B. Q.; YANG, Y. X.; SONG, H. B.; XUE, W. L.; LIANG, W. S.; ZHANG, P. Y. Further investigation on the role of selenium deficiency in the aetiology and pathogenesis of Keshan disease. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 10, p. 316-26, 1997.

XUE, H.; WANG, W.; LI, Y.; SHAN, Z.; TENG, X. Selenium upregulates CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in iodine-induced autoimmune thyroiditis model of NOD.H-2(h4) mice. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 7, p. 595-601, 2010.

YAP, G.; PESIN, M.; SHER, A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 628-31, 2000.

YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 6, p. 1663-7, 1989.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 47, p. 82-91, 2008.

WAGHABI, M. C.; DE SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; KERAMIDAS, M.; FEIGE, J. J.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; BAILLY, S. Pharmacological inhibition of transforming growth factor signaling decreases infection and prevents heart damage

in acute Chagas' disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4694-4701, 2009.

WEEKS, B. S.; HANNA, M. S.; COOPERSTEIN, D. Dietary selenium and selenoprotein function. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 18, n. 8, p. 127-32, 2012.

WHANGER, P.; VENDELAND, S.; PARK, Y. C.; XIA, Y. Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans. **Annals of Clinical Laboratory Science**, v. 26, p. 99-113, 1996.

WHO - World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis), disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

WILKOWSKY, S. E.; WAINSZELBAUM, M. J.; ISOLA, E. L. D. *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca^{2+} during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 222, n. 2, p. 386-9, 1996.

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

ZHANG, Z.; WANG, Q.; ZHANG, J.; LI, S.; WANG, X.; XU, S. Effects of oxidative stress on immunosuppression induced by selenium deficiency in chickens. **Biological Trace Element Research**, v. 149, p. 352-61, 2012.

ZHANG, H.; HU, X.; LIU, X.; ZHANG, R.; FU, Q.; XU, X. The Treg/Th17 imbalance in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 2, p. 112-21, 2014.