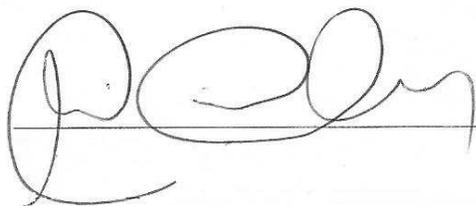

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

JANAINA FERNANDA GONÇALVES NETO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO
DURANTE A GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
AS CEPAS Y E BOLÍVIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para
obtenção do Título de Doutor em
Parasitologia.



Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

CAMPINAS
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G586a

Gonçalves Neto, Janaina Fernanda
Avaliação dos efeitos da suplementação de zinco durante a gestação de camundongos infectados com as cepas Y e Bolívia de *Trypanosoma cruzi* / Janaina Fernanda Gonçalves Neto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Sérgio de Albuquerque.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Zinco. 3. Suplementos dietéticos. 4. Prenhez. 5. Parasitemia. I. Albuquerque, Sérgio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of effects the zinc supplementation during pregnancy in infected mice with Y and Bolívia strain of *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave em inglês: *Trypanosoma cruzi*; Zinc; Dietary supplements; Pregnancy; Parasitemia.

Área de concentração: Protozoologia.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

Banca examinadora: Sérgio de Albuquerque, Urara Kawazoe, Marlene Tiduko Ueta, Marco Aurélio Guimarães, José Clóvis do Prado Júnior.

Data da defesa: 14/06/2006.

Campinas, 14 /06/ 2006.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Profª. Dra. Urara Kawazoe

Profª. Dra. Marlene Tiduko Ueta

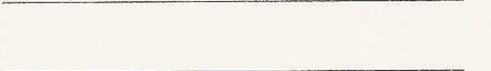
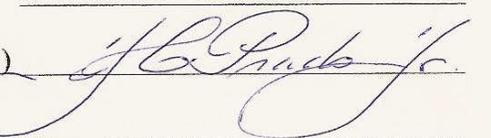
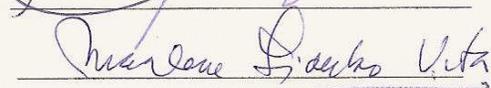
Prof. Dr. Marco Aurélio Guimarães (FMRP – USP)

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior (FCFRP – USP)

Profª. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães

Profª. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Prof. Dr. Gutemberg de Melo Rocha (FMRP – USP)



Ao Rogélio

A minha realização profissional e pessoal deve-se a sua presença, ao amor, carinho, compreensão e incentivo, durante todos os dias.

Te amo pra sempre!

Aos meus Pais,

A nossa convivência harmoniosa, o amor e o incentivo me ajudaram na realização desse trabalho.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, que depois de tantos anos de convivência, tornou-se meu orientador e amigo, apoiando-me em todas as minhas decisões. Muito obrigada por tudo!

Agradeço a todos os docentes, funcionários, pós-graduandos e estagiários do laboratório de Parasitologia – Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela amizade, colaboração, incentivo que sempre recebi durante a pós-graduação, tornando a minha trajetória ora encerrada, uma experiência pessoal e profissional inesquecível e enriquecedora.

Aos docentes, funcionários e amigos do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, pelo apoio, compreensão e acolhida, que mesmo à distância proporcionaram uma amizade agradável.

Aos técnicos do laboratório de Histologia da disciplina de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pelos ensinamentos, amizade, paciência e espaço concedido durante a etapa dos estudos histológicos do presente trabalho.

Ao técnico Alexandre, do laboratório de Histologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Franca – UNIFRAN, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

Aos técnicos Valdir (Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP) e Perpétua (Departamento de Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP), pelo auxílio, amizade, paciência e tempo dispensado durante a etapa da quantificação de Zinco.

À CAPES, pelo auxílio financeiro essencial para a realização do trabalho.

Aos animais, ficam minhas desculpas pela morte necessária para a realização dessa pesquisa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Obrigada pela experiência compartilhada.

FORÇA INTERIOR (Rita Foelker)

Há sempre um momento em nossas vidas, quando percebemos que a força necessária a todas as criaturas não é mais a expansão violenta dos impulsos, mas aquela força que a árvore colhe do solo e transforma em folhas e frutos; aquela força que, presente na correnteza conduz adiante; que, junto às sementes, multiplica a vida; que, dentro das flores faz florescer.

Deus, obrigada pela força interior que me fortalece todos os dias e obrigada por seu amor.

SUMÁRIO

I. RESUMO	xii
II. ABSTRACT	xiv
III. INTRODUÇÃO	01
1. Doença de Chagas	01
2. Transmissão Congênita da Doença de Chagas	07
3. Micronutrientes - Zinco	12
4. Importância do Zinco na Gestação	16
5. Zinco e Doença de Chagas	20
IV. OBJETIVOS	22
V. MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Princípios Éticos na Experimentação Animal	24
2. Parasito	24
3. Grupos experimentais	24
4. Parasitemia	26
5. Peso e medidas dos animais	27
6. Avaliação Pós-natal dos Neonatos	27
7. Mortalidade	28
8. Histologia	28
8.1. Análise do Parasitismo tecidual	28
8.2. Análise de Processos Inflamatórios	29
9. Determinação das Concentrações de Zinco por Espectrofotometria de Absorção Atômica	29
9.1. Preparação dos Padrões e Vidrarias	29
9.2. Avaliação Quantitativa de Zinco Plasmático	30

9.3. Avaliação Quantitativa de Zinco Tecidual	31
10. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Sulfato de Zinco em cultura de células	32
11. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Sulfato de Zinco em cultura de células infectadas com <i>T. cruzi</i>	33
12. Avaliação tripanocida “ <i>in vitro</i> ” do Sulfato de Zinco sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	34
13. Análise Estatística	35
VI. RESULTADOS	36
1. Parasitemia	36
2. Peso e medidas	38
2.1. Peso das Fêmeas não Prenhas	38
2.2. Peso das Fêmeas Prenhas	38
2.3. Peso dos Fetos	41
2.4. Peso das Placentas	42
2.5. Comprimento dos Fetos	42
3. Avaliação Pós-natal dos Neonatos	43
3.1. Peso dos Neonatos	44
3.2. Comprimento dos Neonatos	45
4. Mortalidade das fêmeas	46
5. Histologia	48
5.1. Análise do Parasitismo tecidual	48
5.1.1. Coração	49
5.1.2. Baço	51
5.1.3. Fígado	53
5.1.4. Placenta	55
5.1.5. Fetos e neonatos	60
5.2. Análise de Processos Inflamatórios	62
5.2.1. Coração	62
5.2.2. Baço	65
5.2.3. Fígado	65

5.2.4. Placenta	71
6. Determinação das Concentrações de Zinco por Espectrofotometria de Absorção Atômica	72
6.1. Avaliação Quantitativa de Zinco Plasmático	72
6.1.1. Fêmeas não Prenhas	72
6.1.2. Fêmeas Prenhas	72
6.2. Avaliação Quantitativa de Zinco Tecidual	74
6.2.1. Coração	74
6.2.2. Baço	76
6.2.3. Fígado	78
6.2.4. Placenta	80
6.2.5. Fetos	81
7. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Sulfato de Zinco em cultura de células	83
8. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Sulfato de Zinco em cultura de células infectadas com <i>T. cruzi</i>	86
9. Avaliação tripanocida “ <i>in vitro</i> ” do Sulfato de Zinco sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	89
VII. DISCUSSÃO	92
VIII. CONCLUSÃO	125
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

I. RESUMO

Dados da literatura relataram a importância da suplementação ou da ausência de determinados micronutrientes no comportamento de uma infecção. Assim como, durante a gestação, a concentração de Zinco (Zn) no plasma materno diminui devido a diversas alterações fisiológicas, aumento da absorção e transferência fetal. Entretanto, a avaliação da suplementação de micronutrientes durante a infecção chagásica pouco tem sido discutida. Diante dos benefícios proporcionados por meio da suplementação de Zn sobre algumas doenças infecciosas e durante a gestação, foram objetivos do presente trabalho: determinar as concentrações plasmáticas e teciduais de Zn, avaliar os efeitos da suplementação desse micronutriente durante a gestação de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* e os efeitos *in vitro* em cultura de células. Foram utilizados camundongos Swiss prenhas e não prenhas, infectadas com duas cepas distintas de *T. cruzi*. Esses animais foram suplementados com 20mg/Kg de sulfato de zinco durante 7 dias (cepa Y) e 14 dias (cepa Bolívia). Após a suplementação diversos parâmetros foram avaliados: parasitemia, peso materno, peso e tamanho dos fetos, desenvolvimento dos filhotes após o nascimento, as concentrações plasmáticas e teciduais de Zn, taxa de mortalidade, aspectos histopatológicos e os efeitos *in vitro* em cultura de células. De acordo com os resultados obtidos, foi observado que as fêmeas infectadas que receberam suplementação de Zn apresentaram redução da parasitemia; não alterou o peso das fêmeas, da prole, das placentas; não alterou o comprimento dos fetos e dos neonatos, o peso dos neonatos e a taxa de mortalidade. Histologicamente, a suplementação diminuiu a quantidade de ninhos nos tecidos avaliados de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e diminuiu a quantidade de infiltrados inflamatórios. A dosagem de zinco plasmático e tecidual demonstrou que a suplementação

aumentou a concentração de zinco no plasma e nos tecidos dos animais infectados. Em relação à avaliação *in vitro* do Sulfato de Zinco, foi verificado que as concentrações utilizadas foram citotóxicas, porém apresentaram potencial tripanocida sobre as formas intracelulares de *T. cruzi*. Sendo assim, a suplementação de zinco durante a prenhez em camundongos infectados com *T. cruzi*, proporcionou resultados benéficos na concentração plasmática, desta forma, melhorando o desenvolvimento fetal e auxiliando no controle da carga parasitária.

II. ABSTRACT

A bulk of information concerning the relevance of supplementation and absence of certain nutrients in the modulation of the infection is available in the literature. Several physiological alterations can severely compromise plasmatic zinc levels during gestation, which is characterized by low zinc levels due to enhanced absorption of micronutrients and fetal transference. The benefits of zinc supplementation during the course of infectious diseases and during pregnancy are well known facts. Few data can be found concerning the effects of zinc supplementation during chagasic infection. The objectives of this work were to evaluate the plasmatic and tecidual concentration of zinc, the possible beneficial effects of zinc supplementation in pregnant and infected *Mus musculus* not only regarding to control maternal parasite levels but also to reduce fetal damage, and to evaluate the *in vitro* effects in cell culture. Pregnant and non pregnant *Swiss* mice were i.p. infected with two different *T. cruzi* strains (Bolivia and Y strains). Animals were daily supplied with 20mg/Kg of zinc sulphate during 7 days for Y strain and 14 days for Bolívia. Several parameters were evaluated: parasitemia, maternal weight, fetal size and weight, development of the litter after birth, plasmatic and tecidual concentration of Zn, mortality rate, hystopathology, and the effects of Zn supplementation on cell culture. Pregnant and infected females supplemented with Zn displayed reduced parasitemia, did not enhance body weight, bigger litters and placental size and weight. The presence of this micronutrient did not alter the length of fetuses and neonates, as well its weight and mortality rate. The hystopathological observation for Bolivia strain, showed reduced number of amastigote burdens in all evaluated organs and low inflammatory infiltrate. Plasmatic and tecidual zinc concentration were elevated in all animals supplemented with

zinc. The *in vitro* observations of *T. cruzi* amastigote forms in the presence of zinc sulphate revealed a potential tripanocidal effect but also a citotoxic effect on cell culture. We concluded that zinc supplementation during pregnancy of infected mice in some way triggered a stimulatory immune modulation, leading to a better fetal development, reduced mortality rate and control of blood and tecidual parasite burdens.

III. INTRODUÇÃO

1) Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma das patologias de mais ampla distribuição no Continente Americano, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por Carlos Chagas em 1909. A Organização Mundial de Saúde estima que existam entre 16 a 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas, desde do norte do México até o sul da Argentina e Chile, e que aproximadamente 100 milhões de pessoas correm risco de contaminação (WHO, 2003).

Essa enfermidade é um exemplo típico resultante das alterações causadas pelo homem ao meio ambiente, das distorções econômicas e injunções sociais. Anteriormente, *T. cruzi* se relacionava estritamente com o meio silvestre, circulando entre mamíferos, através da transmissão vetorial e via oral (ingestão de vetores e mamíferos infectados). O homem ao invadir esses ecótopos, incluiu-se no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo ao Hemíptero vetor, condições ideais de abrigo e oferta alimentar, estabelecendo a transmissão vetorial (Dias; Coura, 1997; Vinhaes; Dias, 2000). Tal fato proporcionou novos mecanismos de transmissão, tais como as transmissões transfusional e transplacentária (VINHAES; DIAS, 2000).

A transmissão transfusional é responsável por aproximadamente 10% dos casos, onde o risco de adquirir a infecção após receber a transfusão de sangue de doadores infectados é de aproximadamente 20%. Entretanto a transmissão transplacentária ou congênita é considerada como o terceiro mais importante mecanismo de transmissão, onde

aproximadamente 5.000 – 18.000 casos em áreas endêmicas são notificados por ano. Sendo que, a probabilidade da transmissão de uma mulher chagásica para o feto é de 1 – 10%. A transmissão através da contaminação acidental em laboratório e em transplantes é considerada como mecanismos de transmissão esporádicos (PRATA, 2001).

Microepidemias da doença de Chagas aguda, através da transmissão oral por alimentos contaminados (carne, caldo de cana-de-açúcar e açai – *Euterpe oleracea*), e a transmissão vetorial tem sido relatada por cortadores de piaçava (*Leopoldinia piaçaba*), especialmente na região Amazônica (COURA et al., 1994).

A patogenia da infecção chagásica está especialmente determinada por características próprias do hospedeiro e da população infectante. Assim, o decurso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores como a temperatura ambiental, idade, sexo e constituição genética do hospedeiro (BRENER, 2000). Entretanto, as características das populações do parasita aparentemente exercem maior influência na evolução da infecção em hospedeiros experimentais.

Populações de *T. cruzi* circulam na natureza parasitando o homem, reservatórios domésticos e silvestres, assim como vetores. Quando isoladas e estudadas em laboratório, essas populações do parasita de origem conhecida, apresentam características distintas. Sabe-se que as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas são determinadas entre outros fatores, pela grande diversidade de cepas de *T. cruzi*, com características morfológicas diferenciadas.

Já em 1909, quando descreveu *T. cruzi*, Chagas enfatizou a existência de formas diferentes que apareciam na corrente circulatória e, até hoje, as tentativas de correlacionar o polimorfismo do parasita com seu comportamento biológico têm tido

poucos resultados práticos. As dificuldades aumentam ainda mais quando se correlacionam os dados morfológicos das amostras com suas ações patogênicas, e respectivos quadros clínicos, tanto no homem como em animais de experimentação (FERRIOLLI FILHO et al., 1968; ANDRADE et al., 1970).

Muitas vezes, as cepas de *T. cruzi* diferem em termos epidemiológicos, patogênicos, bioquímicos, imunológicos, resposta ao tratamento, preferência pelo hospedeiro, distribuição geográfica, virulência e tropismo tissular (LIMA et al., 1999; PRATA, 2001).

As amostras com predomínio de formas delgadas apresentam período pré-patente e curvas parasitêmicas de ascensão e queda rápidas. Já as amostras constituídas por formas largas demonstram um período pré-patente mais longo, e curvas parasitêmicas de ascensão e descenso lentos e progressivos (ANDRADE et al., 1970; BRENER; CHIARI, 1983).

Baseadas nas variações dos padrões morfológicos e da parasitemia durante o curso da infecção experimental por diferentes amostras de *T. cruzi*, e na distribuição dos parasitas tissulares, Andrade em 1976 estabeleceu o grupamento das cepas, onde populações de formas tripomastigotas finas dão origem a parasitemias muito intensas e fatais, com evidente reticulotropismo e populações com predominância de formas largas determinantes de infecções prolongadas e de acentuado miotropismo.

Ainda, as cepas com predomínio de formas largas foram caracterizadas com tropismo por células musculares, pela presença de receptores específicos na membrana celular e porque essas cepas estariam mais adaptadas ao desenvolvimento no inseto vetor,

enquanto que as formas finas ou delgadas estariam mais adaptadas para cumprirem o ciclo tecidual (MELO; BRENER, 1978).

A variabilidade intraespecífica de *T. cruzi* pode ser facilmente verificada por meio de sua morfologia, mas muitos autores relataram que as diferenças genéticas do parasita contribuem para sua diversidade. Sendo assim, a elucidação da complexa estrutura das populações de *T. cruzi*, está inspirada em um esforço de se determinar, por meio de técnicas de bioquímica e biologia molecular, marcadores que correlacionem essa estrutura com características específicas da relação parasito-hospedeiro.

Dessa forma, por meio de análise genética dos zimogramas de cepas de *T. cruzi* isoladas de uma área rural no Brasil, foram diferenciados três grupos de perfis isoenzimáticos, denominando-os de zimodema Z1 (ciclo de transmissão silvestre), Z2 (ciclo de transmissão doméstico) e Z3 (cepas isoladas de tatus e raramente do homem) (MILES et al., 1980).

O advento do estudo do DNA, baseado em marcadores multilocais como *DNA fingerprinting* (Macedo et al., 1992), *random-amplified polymorphic DNA* (Tibayrenc et al., 1990) e *simple-sequence-repeat PCR* (Zingales et al., 1997) mostraram grande nível de variabilidade genética intraespecífica do parasito. Amplificação das seqüências do gene do RNA ribossômico (rRNA) 24S α e do gene mini-exon não transcrito por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), indicaram um claro dimorfismo entre os isolados de *T. cruzi*, permitindo a definição de duas linhagens (SOUTO; ZINGALES, 1993; SOUTO et al., 1996; FERNANDES et al., 1998).

Na tentativa de se agrupar os parâmetros morfológicos e as características moleculares de diferentes linhagens de *T. cruzi*, a comunidade científica agrupou as

diferentes características comportamentais do parasito em dois diferentes grupos. O grupo *T. cruzi* I foi relacionado com o ciclo silvestre, representando a forma original de *T. cruzi*, sendo que esse tipo de infecção foi encontrada na região Amazônica. O grupo *T. cruzi* II tem sido associado com roedores e triatomíneos. Ambos, os grupos *T. cruzi* I e II foram associados às lesões cardíacas em infecções humanas, e *T. cruzi* II também está relacionado com lesões do trato digestório (PRATA, 2001).

Essa diversidade molecular de *T. cruzi* pode afetar o organismo hospedeiro em nível tecidual, pois recentes estudos demonstraram que durante a fase aguda em camundongos, diferentes grupos genotípicos do parasito induziram distintas histopatologias (De DIEGO et al., 1998). Sendo assim, alguns pesquisadores sugeriram que a variabilidade na expressão da doença de Chagas pode ser influenciada pela diversidade genética e biológica de *T. cruzi* (De Diego et al., 1998; Macedo; Pena, 1998), além da genética do hospedeiro como um fator determinante na suscetibilidade à infecção.

Diante da variabilidade das cepas do parasito, foi relatada a hipótese que o tipo de cepa pode eliciar maior ou menor resposta celular ou humoral, criando condições para a manutenção da virulência e do controle da infecção. Cepas altamente virulentas podem destruir seus hospedeiros e as menos patogênicas, podem contribuir para a transmissão do parasita antes que estes sejam destruídos pelo sistema imunológico do hospedeiro (EBERT; HERRE 1996).

A resposta imune celular é um importante fator no controle da infecção em todas as fases da doença, e a ineficácia do sistema imune pode resultar no aumento do parasitismo sanguíneo e tecidual (SARTORI et al., 1999).

A resposta humoral específica é de grande importância para o controle dos níveis dos parasitas circulantes (BRENER, 1980). A fase crônica da infecção com *T. cruzi* é

caracterizada por baixa parasitemia associada a altos níveis de anticorpos específicos, que induzem a lise das formas tripomastigotas mediada por complementos (KRETTLI; BRENER, 1982; KRETTLI et al., 1982). Outra característica da resposta imune humoral durante a infecção é a ativação de células B policlonais logo após a infecção e persistindo durante a fase crônica (D'IMPERIO LIMA et al., 1986).

In vivo, *T. cruzi* demonstra tropismo para macrófagos, fibroblastos, epitélio, músculos, e células nervosas (ANDRADE, 1982). Entretanto, *in vitro* a interação do parasita e célula hospedeira tem sido estudada usando macrófagos (Alcântara; Brener, 1978), células musculares (Dvorak; Howe, 1976) e fibroblastos (KANBARA; NAKABAYASHI, 1983).

A infecção da célula do hospedeiro, essencialmente não fagocíticas como os fibroblastos, pelo *T. cruzi* ocorre em duas fases. Na primeira fase, o parasita adere na membrana da célula alvo, e posteriormente, penetra ativamente na célula (BOSCHETTI et al., 1987; ABUIN et al., 1989). Os processos de adesão e interiorização ocorrem por meio de receptores localizados na membrana da célula alvo e do parasita (SCHENKMAN et al., 1991).

No tecido, a resposta imunológica representa-se de forma focal e difusa. A reação focal é mediada pela presença do parasita, que penetra na célula hospedeira e multiplica-se, causando posteriormente a sua ruptura. A reação difusa não está relacionada diretamente com a presença do parasita, ocorrendo geralmente durante a fase aguda e fase crônica (ANDRADE, 1999).

Nesse sentido, a variabilidade das cepas de *T. cruzi* pode induzir respostas imunológicas diferenciadas, que podem influenciar na suscetibilidade das cepas frente aos diversos compostos testados sobre esse parasito.

Em bancos de sangue, a substância efetiva quimioproliticamente contra as formas tripomastigotas presentes nas amostras a serem transfundidas é a violeta de genciana. Entretanto, muitas restrições têm sido feitas quanto ao uso dessa substância, devido sua coloração violeta e uma possível ação mutagênica (DOCAMPO; MORENO, 1990).

Atualmente o tratamento dessa enfermidade é realizado com duas substâncias, o nitrofurano Nifurtimox (Lampit ®) e o 2-nitroimidazol benzonidazol (Rochagan®) (CROFT et al., 1997). Ambas as substâncias são efetivas na redução da severidade da doença durante a fase aguda e congenitamente, porém sem efeitos na terapia da infecção na fase crônica (MUELAS et al., 2002). Essas substâncias são administradas por longos períodos, freqüentemente causando graves efeitos colaterais e cura parasitológica de apenas 50% dos pacientes tratados (KIRSHHOFF, 1994).

Sendo assim, nas últimas décadas milhares de substâncias e produtos naturais foram estudados com intuito de encontrar uma substância incolor, sem efeitos colaterais e eficientes no combate ao *T. cruzi*.

2) TRANSMISSÃO CONGÊNITA DA DOENÇA DE CHAGAS

Na medida em que as formas clássicas de transmissão da doença de Chagas, como a vetorial e a transfusional estão sendo controladas, outras formas de transmissão menos freqüentes como transplante de órgãos e a transmissão congênita vêm demonstrando importância crescente (REICHE et al., 1996).

Carlos Chagas (1911) foi o primeiro a sugerir a existência de infecção congênita por *T. cruzi*, ao observar hepatomegalia, linfadenomegalia e hipertrofia da tireóide, numa criança de vinte e três dias de idade, cuja mãe era portadora de tripanossomíase.

A transmissão congênita da doença de Chagas constitui sério problema de saúde pública no contexto epidemiológico da doença, em áreas endêmicas e não endêmicas, sendo referida na literatura como o terceiro mais importante mecanismo de transmissão, devido à migração das populações rurais para centros urbanos (DIAS, 1988; WHO, 1991; BITTENCOURT, 2000; PRATA, 2001).

Formas menos freqüentes de transmissão da doença de Chagas podem ocorrer pela contaminação oral através do líquido amniótico, e a transmissão hematogênica, durante o trabalho de parto. Há também a possibilidade da transmissão pelo leite materno em mulheres na fase aguda da infecção ou por meio do sangramento dos mamilos (SARASÚA, 1993).

Estudos sobre a prevalência da infecção chagásica em gestantes e sobre a incidência de transmissão congênita nas Américas do Sul e Central resultaram na constatação de 2 – 51% em alguns centros urbanos e de 23 – 81% em áreas rurais (BITTENCOURT, 1988; WHO, 1991; BITTENCOURT, 2000). No Brasil, essa transmissão é menor com relação às freqüências apresentadas na Bolívia, no Chile e na Argentina (PRATA, 2001).

Atualmente na Argentina, a transmissão congênita é mais importante via de transmissão, visto que, o número estimado de casos congênitos é 10 vezes mais freqüente do que os casos agudos pela transmissão vetorial (GÜRTLER et al., 2003).

Esses dados epidemiológicos podem não refletir verdadeiramente a situação da infecção chagásica congênita, pois o diagnóstico da doença em mulheres gestantes e recém-nascidos não é realizado rotineiramente em muitos países endêmicos para *T. cruzi*. Assim, a magnitude dessa forma de transmissão ainda não foi bem estabelecida (GÜRTLER et al., 2003).

A transmissão congênita pode ocorrer durante a fase aguda, pois esse período é caracterizado por elevadas e persistentes parasitemias. Gestantes infectadas com *T. cruzi*, porém assintomáticas, podem infectar o feto através da placenta e ocasionalmente durante a amamentação (BITTENCOURT, 1992).

A frequência da infecção fetal em mulheres cronicamente chagásicas é de aproximadamente 1 – 6% (NISIDA et al., 1999). Estudos demonstraram que 25 a 67% de recém nascidos infectados podem ser assintomáticos, provavelmente porque adquiriram a infecção no último mês de gestação (FREILIJ; ALTCHEH, 1995).

A infecção maternal pelo *T. cruzi* determinou o aumento da frequência de prematuros, abortos e natimortos (BITTENCOURT, 1988; HERNÁNDEZ-MATHESON et al., 1983). Recém nascidos de mulheres infectadas, e que morreram durante o 1º. semestre de idade apresentavam alguma evidência da infecção pelo *T. cruzi* (BLANCO, 2000).

Como consequência da infecção materna, podem ocorrer abortamento e feto macerado, prematuridade, natimortalidade, retardo do crescimento intrauterino, deformações em neonatos, com ou sem sintomatologia da doença de Chagas aguda. Dentre a sintomatologia apresentada pelo recém-nato, são importantes: hepatoesplenomegalia, distúrbios neurológicos, meningoencefalites, tremores, convulsões, zonas de necrose com seqüelas, edemas generalizados, icterícia, hemorragias cutâneas, cianose, hidrocele,

pneumonite, corioretinite e alterações gastrointestinais (PEHRSON et al., 1982; BITTENCOURT, 1984; ALMEIDA; BARBOSA, 1986).

A transmissão congênita da doença de Chagas é transplacentária e parece depender de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro. Ocorre quando as formas tripomastigotas presentes no espaço interviloso atravessam o epitélio trofoblástico e atingem o estroma das vilosidades, dos troncos vilosos ou da placa corial. Esse epitélio separa essas estruturas do sangue materno presente no espaço interviloso. Os tripomastigotas que atingem o estroma das vilosidades coriais penetram nos macrófagos (células de Hofbauer), onde se transformam em amastigotas. Essas formas se multiplicam por divisão binária e após o rompimento dos macrófagos, liberam formas tripomastigotas que penetram em outros macrófagos ou atingem a luz dos vasos coriais, alcançando posteriormente o feto (BITTENCOURT, 1984).

A placenta é derivada do epitélio externo, formado através de uma linhagem de células trofoblásticas, de uma rede vascular e do estroma, que são derivados do mesoderma embrionário. Consideravelmente, a diferenciação das células trofoblásticas produz diferentes células com especialidade endócrina, vascular, imunológica ou de transporte. Além disso, a reorganização tecidual que ocorre durante o desenvolvimento placentário, modifica estruturas uterinas e produz uma grande superfície para trocas gasosas e de nutrientes (CROSS, 2000).

O termo “placenta” refere-se ao estágio em que a nutrição fetal envolve a captura direta de nutrientes da circulação materna (nutrição hemotrófica), sendo controlada diretamente por células trofoblásticas placentárias, a partir do 9.5 – 10.5 dias de prenhez em camundongos (ADAMSON et al., 2002). Anterior a esse estágio existem fortes evidências que a maior fonte de nutrientes para a nutrição fetal são provenientes da secreção das

glândulas uterinas (nutrição histotrófica). Em humanos e camundongos, tais nutrientes estão disponíveis para o feto (através do saco vitelino), via ação fagocítica das células (CROSS et al., 1994; GULBIS et al., 1998; BURTON et al., 2001). As células trofoblásticas interagem com o útero e produzem fatores de crescimento, citocinas e hormônios, tendo como alvo o sistema imune materno, resultando no aumento de fluxo sanguíneo e de nutrientes para unidade feto-placentária (CROSS et al., 2003).

A placenta de roedores, está dividida em três regiões anatomicamente e fisiologicamente distintas: basal ou decídua (está em contato com o útero materno), esponjosa e labiríntica (CROSS, 2000; ADAMSON et al., 2002).

A camada basal ou decídua materna está localizada entre as células gigantes da camada esponjosa e o útero. Em camundongos, essa camada possui comumente artérias centrais e numerosas veias maternas localizadas periféricamente (REDLINE; LU, 1989; WOODING; FLINT, 1994; ADAMSON et al., 2000). As veias e as artérias maternas da camada decídua da placenta em camundongos são continuadas pelos canais venosos e arteriais da camada esponjosa (PIJNENBORG, 1996).

A camada esponjosa está localizada entre a camada labiríntica e a camada basal sendo composta por células esponjosas, células gigantes e células produtoras de glicogênio. Essa região não contém sangue fetal, mas é atravessada por vasos sanguíneos maternos (através do qual o sangue materno é levado e trazido para a camada labiríntica) (PIJNENBORG et al., 1981; REDLINE; LU, 1989).

A camada labiríntica contém vasos sanguíneos fetais e maternos, pelos quais, os sangues materno e fetal circulam independentemente, possibilitando o transporte bidirecional de nutrientes e excretas entre a mãe e o feto (CROSS, 2000).

A placenta de camundongos apresenta grande crescimento no 10.5 dia de prenhez até o dia do parto devido à expansão da camada labiríntica, onde a formação extensiva dos capilares fetais está presente somente no 12º. dia de gestação. Esses dados sugerem fortemente que a placenta definitiva de camundongos está estabelecida na metade da gestação (ADAMSON et al., 2002; GEORGIADES et al., 2002).

A placenta humana e murina diferem no tipo de ramificação, onde a humana é do tipo vilosa apresentando inúmeras ramificações e sub-ramificações, enquanto que as ramificações da porção labiríntica murina são mais interconectadas, sendo chamadas de ramificações em labirinto. Como resultado dessa diferença, o espaço no qual o sangue materno circula na placenta fetal humana é mais aberto, quando comparado à placenta murina (WOODINGG; FLINT, 1994; LEISER et al., 1997). Portanto, a possibilidade de transmissão congênita em humanos é maior do que em murinos (BADRA, 2004).

Lesões placentárias na doença de Chagas sem infecção fetal já foram documentadas (ANDRADE, 1982; CARLIER et al., 1987). Entretanto, esses casos foram considerados como transmissão congênita em nível placentário, uma vez que a placenta é um órgão fetal (BITTENCOURT, 1984). Portanto, além de oferecer uma barreira mecânica, a placenta constitui uma barreira imunológica, uma vez que produz citocinas e possui capacidade fagocítica (BITTENCOURT, 1995).

3) MICRONUTRIENTES – ZINCO

Substâncias inorgânicas como o Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Selênio (Se), Manganês (Mn), Cromo (Cr), Cobalto (Co) e Iodo (I) são nutricionalmente

necessários em pequenas quantidades todos os dias para manutenção e determinação de um funcionamento adequado do metabolismo, podendo atuar como cofatores enzimáticos ou estabilizadores de reações químicas, principalmente no que diz respeito à neutralização de radicais livres (BEDWAL; BAHUGUNA, 1994; CUNHA; CUNHA, 2000).

O Zinco é um dos principais minerais constituintes da crosta terrestre. Sua distribuição não é homogênea e sua concentração é variável de acordo com o local estudado (SCHROEDER et al., 1967). Esse microelemento tem como características número atômico 30, peso atômico 65,4 e ponto de fusão de 419°C (HALSTEAD et al., 1974).

A importância do Zn para o crescimento de microorganismos foi inicialmente documentada por Raulin em 1869, que observou a necessidade desse micronutriente para o crescimento do *Aspergillus niger* em meio de cultura (BERTRAND; JAVILLIER, 1974). A partir de 1926, Sommer; Lipman demonstraram a importância do Zn para o crescimento de plantas, assim como a distribuição universal desse micronutriente, por meio da determinação das concentrações de Zn em tecidos de animais e de plantas. Sendo assim, concluiu-se que o Zn é um elemento traço necessário para crescimento celular, divisão e diferenciação, e desenvolvimento normal (ELIZAGA; FERREIRA, 1985; NEGGERS et al., 1990). Quantidades maiores de Zn são requeridas durante períodos de rápido crescimento, como na gestação, infância e puberdade (NEGGERS et al., 1990).

Após a demonstração da presença de Zn em alimentos, até mesmo no leite materno, foi que o seu valor como nutriente passou a ser considerado (BIRCKNER, 1919). A concentração de Zn no leite é maior do que no plasma de muitas espécies, inclusive em humanos (CASEY et al., 1989).

Somente após o desenvolvimento de uma ração animal deficiente em Zn, por Todd et al. (1934) foi demonstrado o efeito da deficiência desse micronutriente sobre o

crescimento e desenvolvimento de ratos, assim como os efeitos após a suplementação com Zn (TUCKER; SALMON, 1955). Diante desse fato, foi relatada a importância do Zn na dieta de camundongos, demonstrando significativa redução de leucócitos, aumento da concentração de corticosterona e redução da resposta de hipersensibilidade (FRAKER et al., 1987).

A importância do Zn na nutrição humana foi descoberta por PRASAD (1991). E atualmente, os mecanismos responsáveis pelas alterações patofisiológicas, perante a deficiência de Zn foram estabelecidas por WELLINGHAUSEN (2001).

A participação do Zn no metabolismo protéico é fundamental, a ponto de ser comparado a um aminoácido essencial (GOLDEN; GOLDEN, 1981). Sendo assim, a deficiência desse micronutriente pode induzir anorexia de instalação rápida, retardo de crescimento, sensibilidade aumentada à oferta de nitrogênio, aumento da amônia e uréia sanguíneas, diminuição da síntese protéica e redução da relação ácido ribonucléico / ácido desoxirribonucléico (RNA/ DNA) (PRASAD, 1983).

No plasma, o Zn geralmente está ligado às proteínas existentes e representa aproximadamente menos 1% da quantidade de Zn corpórea (LAZEBNIK et al., 1988).

Em relação a concentração de Zn nos tecidos, alguns autores relataram a presença desse micronutriente nos ossos, no pâncreas, nos rins, no intestino, na próstata, nos músculos e principalmente no fígado (FORBES, 1964; PRASAD, 1983; SOWA; STEIBERT, 1985).

A absorção, o metabolismo e a liberação hepática dependem de uma adequada concentração de Zn nos tecidos, da quantidade ingerida e da concentração desse micronutriente presente no plasma (LASTRA et al., 1997; SESHADRI, 2001). A absorção

intestinal de Zn é considerada um dos principais mecanismos para manter o equilíbrio desse micronutriente em humanos e em animais (JACKSON; LOWE, 1992).

A deficiência de Zn causa retardo no crescimento, anorexia, problemas gastrointestinais, cirrose hepática, acrodermatites enteropática, dermatites, mudanças de temperatura corporal, inibe a maturação sexual, síntese de proteínas, atrofia do timo e redução da imunocompetência (PRASAD, 1979; 1983). Os grupos mais suscetíveis à deficiência de Zn são mulheres gestantes, crianças em desenvolvimento e crianças de países subdesenvolvidos (PRASAD, 1983; LASTRA et al., 1997).

Em relação às infecções, a deficiência de Zn pode prejudicar a defesa contra infecções por bactérias, parasitas, fungos e vírus (PEKAREK et al., 1977; VAN EECHHOUT et al., 1976; SHANKAR; PRASAD, 1998; WELLINGHAUSEN, 2001). Em animais, esse fato já foi relatado por diversos autores, como infecções causadas por: vírus *Herpes simplex* (Feiler et al., 1982), *Salmonella enteritidis* (Kidd et al., 1994), *Trypanosoma cruzi* (Fraker et al., 1982), *Trypanosoma musculi* (Lee et al., 1983), *Toxoplasma gondii* (Tasci et al., 1995), *Plasmodium yoelli* (Shankar et al., 1995), *Strongyloides ratti* (Fenwick et al., 1990a), *Trichinella spiralis* (Fenwick et al., 1990 b), *Fasciola hepatica* (Flagstad et al., 1972) e *Schistosoma mansoni* (NAWAR et al., 1992).

Mudanças na concentração de Zn plasmático ocorreram devido à severidade e o estágio de infecção, como foi demonstrado em animais infectados com *Trypanosoma brucei* que receberam dieta deficiente em Zn apresentaram decréscimo das concentrações plasmáticas de Zn e alterações na parasitemia (MWANGI et al., 1995).

Vários estudos demonstraram os benefícios da suplementação de Zn sobre doenças infecciosas em humanos (SHANKAR; PRASAD, 1998). Grupos tratados com Zn

apresentaram redução de infecções por agentes oportunistas, especialmente por *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* (MOCCHIGIANI et al., 1995).

O sistema imunológico é influenciado pelo Zn através de proteínas dependentes desse micronutriente, que geralmente estão envolvidas na função celular, como, replicação, transcrição e tradução (BAUM et al., 2000). Além disso, o Zn é um cofator essencial para produção do hormônio do timo, que possui propriedades imunorreguladoras.

4) IMPORTÂNCIA DO ZINCO NA GESTAÇÃO

A gestação é um período onde ocorre um aumento da necessidade metabólica para as mudanças fisiológicas e para o desenvolvimento fetal (KING, 2000b). Essas alterações fisiológicas resultam no aumento do volume plasmático e de células vermelhas do sangue, redução da concentração de proteínas e micronutrientes circulantes, produção de hormônios que redirecionam os nutrientes através da placenta e glândulas mamárias (LADIPO, 2000). Todas as alterações variam de mulher para mulher, estado nutricional prenatal e gestacional, determinantes genéticos, comportamento maternal e condições sócio-econômicas (LADIPO, 2000; KING, 2000b).

Durante o período gestacional, quantidades inadequadas ou a falta de vitaminas ou minerais, podem prejudicar a gestante (RAMAKRISHNAN et al., 1999). Além disso, podem ocorrer nascimentos de fetos prematuros, natimortos, retardo no crescimento intrauterino, malformações congênitas, problemas imunológicos e anormalidades no desenvolvimento de órgãos (BLACK, 2001).

De acordo com a literatura, o Zn, o ácido fólico, as vitaminas A e E, o Fe e o Cu, são elementos essenciais durante a gravidez. Tanto o excesso quanto à carência desses

elementos podem ocasionar distúrbios significativos na formação dos tecidos fetais (ASHWORTH; ANTIPATIS, 2001).

A transferência do Zn maternal para os fetos ocorre em cinco etapas. A primeira envolve a passagem através das microvilosidades da membrana, seguida pela transferência entre as células placentárias, atingindo a circulação e fígado fetal, e finalmente, incorporação com a Metalotioneína (MT) (LINDSAY et al., 1994).

A Metalotioneína é uma proteína que exerce importantes funções no metabolismo, como: transporte de metais, desintoxicação promovida pelos metais, proteção contra metais tóxicos, captura e armazenamento de metais livres em excesso, principalmente de Zn e participa na resposta imunológica (LINDSAY et al., 1994; NORDBERG, 1998).

Nos fetos, a concentração de Zn aumenta no último trimestre, principalmente no fígado. Esse aumento está relacionado com a elevação da MT fetal. O aumento prenatal de Zn tem grande importância para o desenvolvimento do neonato após o nascimento, incluindo a maturação do sistema imunológico fetal (LINDSAY et al., 1994). Diante desse fato, a absorção de Zn aumenta aproximadamente 30% por dia no fim do período gestacional e cerca de 21% são absorvidos e transferidos para o feto (KING, 2000a).

Além da MT, a concentração de Zn aumenta no feto no último trimestre devido ao desenvolvimento completo da placenta, o que permite acesso a maior quantidade de Zn circulante e à mobilização desse micronutriente presente na camada decídua (SOLE; NASPITZ, 1996).

A concentração de Zn urinário aumenta no período gestacional e diminui durante a lactação (KING, 2000a). Porém, há relatos de que a excreção de Zn na urina

aumenta ao longo da gestação, possivelmente devido à elevação da filtração glomerular (KLEIN et al., 1995).

No intestino a absorção de Zn não aumenta durante a gestação. Dessa forma, maiores quantidades de Zn são necessárias para suprir o feto e tecidos placentários (KING, 2000a). Entretanto, a absorção de Zn no duodeno de ratos aumenta duas vezes no término da gestação e durante a lactação (DAVIES; WILLIAMS, 1977; JACKSON et al., 1988). Ainda nesse sentido, observaram que a absorção de Zn em mulheres lactantes foi aproximadamente 80% maior do que em mulheres pós-parto não lactantes e mulheres não gestantes (MOSER-VEILLON et al., 1995). Esses dados sugerem que a absorção intestinal de Zn é importante para o controle do metabolismo desse micronutriente durante a gestação.

A associação da carência ou não de outros micronutrientes com a de Zn, durante a gestação, pode atenuar ou acentuar os efeitos deletérios da deficiência de Zn (SOLE; NAPITZ, 1996). Entretanto, a deficiência de vitaminas e minerais específicos varia de acordo com a idade, a estação climática, o grupo étnico, as condições sócio-econômicas e o número familiar ou populacional (BLACK, 2001).

Durante a gestação, os efeitos da deficiência de Zn ocorrem de modo mais acentuado, aumentando os riscos de complicações durante o parto, como hemorragias e infecções; afetando a contração muscular e de certo modo, funcionando como potencializadora para eventuais complicações obstétricas. Além disso, pode causar: 1) malformações do feto principalmente se a deficiência ocorrer durante o período da organogênese; 2) perda de peso, tanto fetal como maternal; interferindo na ação de enzimas Zn dependentes, importantes para a divisão e replicação celulares, podendo acarretar a morte fetal; 3) abortos; 4) nascimento de prematuros, 5) atrofia do timo; e 6) aumento da

suscetibilidade a infecções bacterianas, virais e fúngicas (SOLTAN; JENKINS, 1982; TRAVÉ et al., 1985; BEDWAL; BAHUGUNA, 1994; BLOXAM; BAX, 1996; SOLÉ; NASPITZ, 1996; WELLINGHAUSEN et al., 1997).

Estudos com animais experimentais demonstraram que a falta de nutrientes pode comprometer a função imunológica. Em ratos após o período de lactação, a baixa concentração de alguns elementos traços, promoveu a supressão da resposta imunológica, aumentando assim, a suscetibilidade a infecções (FRAKER et al., 1984). Assim como, a redução da concentração de Zn prejudicou a atividade das células NK (Natural Killer), fagocitose dos macrófagos e a função dos neutrófilos (WELLINGHAUSEN et al., 1997).

Além das alterações já mencionadas, observaram que fetos cujas mães foram submetidas à deficiência de Zn apresentaram comprometimento da função pancreática, com diminuição da síntese de hormônios e enzimas pancreáticas (ROBINSON; HURLEY, 1981).

Os efeitos da deficiência de Zn maternal em embriões de ratos ocorrem rapidamente, pois quatro dias após receber dieta deficiente de Zn, a concentração desse micronutriente foi menor do que em ratos que receberam dieta normal. Isto ocorre porque a concentração de Zn plasmático materno diminui rapidamente no caso de ingestão de dieta deficiente desse micronutriente (HURLEY, 1979).

Diversas substâncias farmacologicamente ativas e mudanças ambientais podem induzir a deficiência de Zn em animais grávidas, através da síntese de MT (KEEN et al., 1993). Isso ocorre porque muitos compostos orgânicos, hormônios endógenos (como os adrenocorticosteróides) e citocinas podem estimular a síntese dessa proteína. Como consequência desse aumento, o Zn é retirado do plasma e posteriormente armazenado no

fígado. Essa deficiência de Zn plasmático reduz a disponibilidade para o feto (KING, 2000a, 2000b).

Alguns autores (Hunt et al., 1984; Garg et al., 1993; Jameson, 1993; Goldenberg et al., 1995; Ladipo, 2000; Osendarp et al., 2001; Wellinghausen, 2001) relataram que a suplementação de Zn melhorou significativamente o desenvolvimento fetal e funções do sistema imunológico; além de reduzir a incidência de complicações maternas e fetais; quadros de diarreia aguda, desinteria e impetigo. Além disso, a suplementação desse micronutriente, tem sido avaliada como medida terapêutica e utilizada na profilaxia da malária (BLACK, 1998).

5) ZINCO E DOENÇA DE CHAGAS

A avaliação de micronutrientes em indivíduos portadores de *T. cruzi* pouco tem sido relatada. Na maioria das citações encontradas na literatura os autores relatam a importância da suplementação ou da ausência de determinados micronutrientes no comportamento da infecção.

A associação entre o aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e a deficiência nutricional de Zn, levou pesquisadores a aventarem a possibilidade de que esse elemento traço é muito importante para a imunidade (WELLINGHAUSEN, 2001).

Entre vários micronutrientes, o estudo do Zn no processo de imunidade celular na doença de Chagas experimental foi descrito por Fraker et al. (1982), onde os autores submeteram camundongos da linhagem BALB/c a diferentes situações de deficiência do metal na alimentação. Posteriormente, observaram que a reposição alterou o comportamento da infecção, melhorando a resposta imune dos animais tratados em relação

àqueles utilizados como controle. Esses resultados foram confirmados por outros autores que indicaram a necessidade do Zn na dieta alimentar, associando-o como um importante co-fator em eventos bioquímicos associados à atividade dos macrófagos e à morte dos parasitas (WIRTH et al., 1989; COOK-MILLS, et al., 1990).

Diante da importância do Zn no desenvolvimento humano ou animal, no sistema imunológico e no controle de doenças infecciosas, a suplementação de Zn durante o período gestacional em camundongos fêmeas infectadas por *T. cruzi* pode ser um importante complemento alimentar, podendo diminuir ou controlar os efeitos causados pela infecção chagásica, tanto nas mães quanto nos fetos.

IV. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

1. Verificar os efeitos da suplementação de Zn durante a gestação de camundongos *Mus musculus*, experimentalmente infectados por duas cepas de *T. cruzi*, em comparação aos grupos não infectados, e submetidos às mesmas condições, avaliando:

- A parasitemia dos grupos experimentais infectados com duas cepas de *T. cruzi* suplementados e não suplementados com Zn.
 - O peso das fêmeas dos grupos experimentais.
 - O peso e o tamanho dos fetos, e o peso das placentas entre os grupos experimentais.
 - O desenvolvimento dos neonatos após o nascimento, através do peso e do tamanho desses animais.
 - A mortalidade das fêmeas dos grupos.
 - Por meio da análise histológica, a taxa de infecção: placenta, fetos, e fígado, coração e baço materno dos diferentes grupos experimentais, bem como os neonatos originados desses grupos, por meio da coloração de Hematoxilina Eosina.
 - Por meio da análise histológica, a presença de processos inflamatórios nos tecidos.
-

- A concentração plasmática de Zn materno, por meio da técnica analítica de Espectroscopia de Absorção Atômica.
- A concentração de Zn no coração, no baço, no fígado materno, nas placentas e nos tecidos fetais de todos os grupos experimentais, por meio da técnica analítica de Espectroscopia de Absorção Atômica.

2. Avaliar “*in vitro*” os efeitos do tratamento com Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$) em diferentes concentrações, após 24 horas, sobre:

- Células LLCMK₂.
 - Células LLCMK₂ infectadas com ambas as cepas de *T. cruzi*.
 - As formas amastigotas de *T. cruzi*.
-

V. MATERIAL E MÉTODOS

1)Princípios Éticos na Experimentação Animal

O presente trabalho foi encaminhado para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, sendo aprovado e protocolado (nº. 05.1.638.53.2) por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

2)Parasito

Foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi* com características morfológicas e filogenéticas distintas. A cepa Y, caracterizada por formas delgadas, macrofagotropismo e alta patogenicidade (Pereira da Silva; Nussenzweig, 1953), sendo classificada como grupo *T. cruzi* II e linhagem 1 (DOST et al., 2002). A cepa Bolívia apresenta característica morfológica de forma larga, tropismo predominante para células musculares e glandulares, baixa patogenicidade (Funayama; Prado Junior, 1974), pertencente ao grupo *T. cruzi* I e linhagem 2 (DOST et al., 2002).

3)Grupos experimentais

Para cada grupo foram utilizados camundongos albinos, *Mus musculus*, linhagem *Swiss*, pesando aproximadamente 40g (fêmeas) e 45-50g (machos), como segue:

Grupo 1 – Camundongos fêmeas não infectadas e não prenhas (nInP) – n = 15;

Grupo 2 - Camundongos fêmeas não infectadas e prenhas (nIP) – n = 20;

Grupo 3 – Camundongos fêmeas infectadas e não prenhas (InP) – n = 15;

Grupo 4 – Camundongos fêmeas infectadas prenhas (IP) – n = 20;

Grupo 5 – Camundongos fêmeas não infectadas e não prenhas, suplementadas com ZnSO₄
(nInPZ) – n = 15;

Grupo 6 – Camundongos fêmeas não infectadas e prenhas, suplementadas com ZnSO₄
(nIPZ) - = 20;

Grupo 7 – Camundongos fêmeas infectadas e não prenhas, suplementadas com ZnSO₄
(InPZ) - = 15;

Grupo 8 – Camundongos fêmeas infectadas e prenhas, suplementadas com ZnSO₄ (IPZ) -
= 20;

Grupo 9 – Camundongos machos não infectados – n = 42

Inicialmente, o camundongo macho permaneceu na caixa sem a presença das fêmeas, durante 48 horas. Após esse período, as fêmeas foram colocadas em contato com o macho por um período de 72 horas, sendo utilizadas três fêmeas para cada macho. A presença do feromônio do macho deixado na caixa estimulou a fêmea a entrar no período de estro, e somente nessa fase do ciclo estral ocorre o acasalamento (FREEMAN, 1994). Após as 72 horas, o macho foi retirado e as fêmeas foram mantidas em caixas individuais, onde receberam ração comercial e água *ad libitum* purificada (SOWA; STEIBERT, 1985).

Os animais pertencentes aos grupos infectados foram infectados via intraperitoneal, com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL de *T. cruzi*. Os camundongos

fêmeas pertencentes aos grupos da cepa Y foram infectados no 12º dia de prenhez, entretanto aqueles pertencentes aos grupos da cepa Bolívia, foram infectados no 5º dia de prenhez. Os dias dos inóculos foram calculados de maneira que os picos parasitêmicos de ambas as cepas ocorressem no 19º dia de prenhez.

Os animais não infectados foram submetidos à suplementação de Zn, que foi iniciada no 10º dia de prenhez. Esse dia gestacional foi escolhido com base nos dados obtidos na literatura (Georgiades et al., 2002), onde o período de nutrição feto-maternal via sangüínea está estabelecido no 10º dia de prenhez, conduzindo as trocas de gases e substâncias através da circulação. Existem grandes evidências que esse período corresponde aos dois últimos trimestres gestacionais em humanos e no 10º dia embriótico em camundongos, onde a placenta destes animais está totalmente desenvolvida e inicia suas funções. Em relação aos animais infectados, o tratamento iniciou-se no 1º dia após o inóculo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Todos os grupos experimentais receberam 20mg ZnSO₄/Kg (Panemangalore et al., 1983) até o dia do pico parasitêmico das respectivas cepas de *T. cruzi*. A suplementação foi realizada por via oral, pois quando administrado principalmente por essa via, o Zn é considerado como não tóxico (FOSMIRE, 1990).

4)Parasitemia

A observação da parasitemia foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brener (1962), no 5º, 9º, 12º, 14º e 16º dia para a cepa Bolívia e no 3º, 5º, 7º e 9º dia para a cepa Y de *T. cruzi*.

5) *Peso e medidas dos animais*

O peso das fêmeas foi avaliado no 1º dia do acasalamento e no 19º dia de prenhez para todos os grupos, por meio de balança semi-analítica (MARTE), com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento materno e verificar se a infecção e a suplementação de Zn influenciaram no peso das fêmeas.

Após a retirada cirúrgica, os fetos e as placentas de 5 camundongos no 19º dia de prenhez, foram pesados em balança de precisão (Adventurer TM – OHAUS- 0.0001g – 210g) e os fetos foram mensurados da extremidade do focinho a base da cauda, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo – 150mm – 6”polegadas), sendo posteriormente fixados em Formalina tamponada 10%.

6) *Avaliação Pós-Natal dos Neonatos*

Na avaliação pós-natal dos neonatos, 5 fêmeas de cada grupo experimental foram observadas durante o período gestacional. Os neonatos originados dessas fêmeas foram acompanhados durante o período pós-natal quanto: ao desenvolvimento corpóreo (peso e tamanho) e a taxa de infecção.

Para avaliar o desenvolvimento corpóreo, foram utilizados paquímetro digital (Mitutoyo – 150mm – 6”polegadas) e balança de precisão (Adventurer TM – OHAUS - 0.0001g –210g). Os neonatos foram mesurados da extremidade do focinho a base da cauda. Em relação à taxa de infecção, foi realizada a histologia de 5 filhotes de cada grupo experimental, com 7 dias de vida.

7)Mortalidade

A taxa de mortalidade das fêmeas foi observada em 5 fêmeas de todos os grupos experimentais desde o 1º. dia do acasalamento até a sua morte natural.

7)Histologia

Os animais foram mortos por meio de deslocamento cervical, seguindo as normas de princípios éticos na experimentação animal do CEUA. Foram utilizados 5 camundongos de todos os grupos experimentais, no 19º dia de prenhez e do pico parasitêmico correspondente a cada cepa (7º dia – cepa Y e 14º dia – cepa Bolívia). Os fetos, placentas, e tecidos maternos (fígado, baço e coração) foram retirados e em seguida fixados em Formalina tamponada 10% por 24hs. Posteriormente os tecidos foram processados histologicamente e cortes histológicos de 5µm de espessura foram preparados, e corados por meio da técnica de Hematoxilina Eosina (HE). A montagem desses cortes nas lâminas foi realizada com intervalo de 70µm, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi* (CAMARGOS et al., 2000).

7.1)Análise do Parasitismo tecidual

O parasitismo tecidual foi estimado através da análise quantitativa, a partir da determinação de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* observados em 50 campos microscópicos (400x). Para esta análise, foram utilizados 15 cortes de 5 μ m dos tecidos de cada animal.

7.2)Análise de Processos Inflamatórios

A partir dos cortes histológicos, foi realizada a análise da presença de infiltrados inflamatórios no coração, no fígado, no baço e nas placentas. No fígado foi realizada a contagem e a medida da área (μm^2) dos processos existentes em 30 campos microscópicos (400x) (Souza et al., 2002), utilizando-se 5 lâminas de cada grupo.

Para calcular a medida da área dos processos inflamatórios, os cortes foram focalizados ao microscópio óptico (400x) munido de uma câmera de captura de imagens e vídeo. As imagens capturadas foram projetadas em programa de computador (KS100 – Zeiss), sendo a área calculada automaticamente após a marcação da região correspondente.

8)Determinação das Concentrações de Zinco por Espectrofotometria de Absorção Atômica

8.1)Preparação dos Padrões e Vidrarias

Sendo o plasma relativamente viscoso, as soluções de calibração do equipamento de espectrofotometria de absorção atômica (AAS – Atomic Absorption

Spectrometry) foram preparadas com solução de glicerol a 5% (50mL de glicerol em 1000mL de água deionizada) (BUTRIMOVITZ; PURDY, 1977).

Inicialmente foi utilizada uma solução padrão (Titrisol - Merck) a 1.000ppm e a partir dessa solução, foi preparada uma solução a 50ppm (1:19), a qual foi utilizada para o preparo das soluções necessárias para a construção da curva padrão (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{gZn/mL}$). Posteriormente, foram adicionados 10 μL de solução de HCl (ácido clorídrico 1:1 com água deionizada), para maior conservação das soluções padrão.

Todas as vidrarias e pipetas utilizadas na preparação das soluções de calibração e na análise das amostras de plasma foram lavadas inicialmente com solução de HNO_3 (1mol/L) (SHAW et al., 1982; GOZZO et al., 1999). Depois esses materiais permaneceram em repouso em solução de EDTA por 24hs (Butrimovitz & Purdy, 1977; Smith et al., 1979), e após esse período, os materiais foram lavados seis vezes em água deionizada.

8.2) Avaliação Quantitativa de Zinco Plasmático

Para a dosagem da concentração plasmática de Zn, foi colhido por punção cardíaca o sangue de cinco camundongos já mortos no dia do pico parasitêmico de cada cepa, correspondente ao 19º dia de prenhez. Microtubos de 2mL contendo o sangue coletado com anticoagulante (Heparina sódica) foram centrifugados a 1500rpm durante 10 minutos a 23°C para separação do plasma. Posteriormente, as amostras de plasma foram transferidas para novos microtubos e congeladas a -20°C, até o dia da leitura. No momento da leitura, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, sendo os microtubos invertidos seis vezes (BUTRIMOVITZ; PURDY, 1977). Após o descongelamento, as amostras foram diluídas (1:1) em água deionizada (SHAW et al., 1982).

Amostras hemolisadas ou contendo componentes celulares foram descartadas, pois foram consideradas inapropriadas para análise, devido ao fato da quantidade de Zn ser maior no interior das células do que no plasma (PASSEY et al., 1985).

A quantificação foi realizada por meio da técnica de AAS utilizando leitor (AA-680 Atomic Absorption/Flame Emission Spectrophotometer – SCHIMADZU). Esse método tem sido mais utilizado para análise de Zn no sangue, devido à simplicidade, rapidez, baixo custo, sensibilidade e precisão (LISKA et al., 1985; FUNG et al., 1997).

Inicialmente foi verificada a curva padrão através da leitura das soluções de calibração e posteriormente foi realizada a leitura das amostras de plasma diluídas.

8.3) Avaliação Quantitativa de Zinco Tecidual

No dia do pico parasitêmico correspondente a cada cepa, 5 camundongos foram mortos por meio de deslocamento cervical. O fígado, o baço, o coração materno, e as placentas e os fetos foram retirados, lavados em PBS e posteriormente armazenados em tubos Falcon de 50mL e congelados.

Para a realização dessa avaliação, foram adaptadas as técnicas descritas por (Yasdani et al., 1990; Luterotti et al., 1992) onde os órgãos foram previamente descongelados e homogenizados em água (5 mL/g) durante 3 minutos, em um homogenizador (JANKEE KUNKEL). O homogenizado aquoso foi centrifugado a 15.000 rpm durante 15 minutos à 12°C. Após esse período, foi adicionado 1mol/L de HCl no sobrenadante e a solução obtida foi homogenizada durante 3 minutos. Em tubo Falcon de 15mL, a alíquota de 1mL da solução obtida foi diluída em 1mL de água deionizada. Os tubos foram centrifugados a 3000rpm por 10 minutos à 12°C. Posteriormente foi realizada a leitura do sobrenadante por meio da técnica de AAS utilizando leitor (AA-680 Atomic

Absorption/Flame Emission Spectrophotometer – SCHIMADZU). As soluções padrões utilizadas nessa avaliação foram às mesmas soluções da quantificação de Zn plasmático.

9) Avaliação “in vitro” do Sulfato de Zinco em cultura de células

Essa avaliação foi realizada sobre cultura de células LLCMK₂ (Monkey Rhesus kidney) (Kloetzel et al., 1984; Tomlinson et al., 1995), mantidas em meio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 7,5% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 0.01mg/mL de Ciprofloxacina (Bayer). A partir dessa cultura, foi utilizada uma suspensão de células na concentração de 1×10^6 células/mL, contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, alíquotas de 200µL/poço foram adicionadas em placa de microtitulação (96 poços) e incubadas a 37°C por duas horas em estufa de CO₂, com umidade de 95%. Após esse período, foram adicionados Benzonidazol e ZnSO₄ nas seguintes concentrações: 5µg, 20µg, 100µg e 200µg /mL. Sendo essa placa novamente incubada em estufa de CO₂, com umidade de 95%, durante 24hs.

A avaliação foi realizada em triplicata para cada concentração de Benzonidazol e ZnSO₄. Como controle positivo (100% de atividade) foi utilizado apenas meio RPMI 1640 sem células e para o controle negativo (sem atividade) o meio com células.

Para verificar a ação do ZnSO₄ sobre as células, foi utilizada a técnica colorimétrica baseada no uso do sal Tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide - ACROS Organics), que mede apenas as células vivas presentes na amostra, podendo ser quantificada pelo espectrofotômetro. O reagente MTT de cor amarelo claro produz o produto Formazan de cor azul escuro quando incubado com células vivas

(MOSMANN, 1983). Sendo assim, finalizado o tempo de incubação da microplaca, foram retirados 100µL/poço e adicionados 10µL/poço de MTT na concentração de 5mg/mL. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 4 horas em estufa de CO₂, com umidade de 95% (MUELAS-SERRANO et al., 2000; 2002).

O produto da reação do MTT a formazan foi solubilizado em isopropanol-ácido (100µL/poço de HCl 0,04N em isopropanol), considerado o solvente mais adequado para essa reação. Posteriormente os poços foram homogenizados e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. A solução obtida foi medida por densidade ótica no espectrofotômetro (Sunrise – TECAN), usando 570 a 630nm de comprimento de onda (MOSMANN, 1983; MUELAS-SERRANO et al., 2000; 2002). Os resultados da leitura foram processados no programa Magellan 3 e editados no programa computacional Prism 3.0, utilizando a seguinte fórmula:

$$1 - [(Y-CN/CN-CP)] \times 100 = \% \text{ de lise}$$

Y = valor da amostra;

CN = controle negativo;

CP = controle positivo.

10) Avaliação “in vitro” do Sulfato de Zinco em cultura de células infectadas com T. cruzi

A metodologia utilizada foi à mesma descrita para a avaliação do ZnSO₄ em cultura de células não infectadas. Entretanto, após o período de incubação por 2 horas da microplaca contendo 1 x 10⁶ células/mL na estufa de CO₂, foram adicionados 5 x 10⁶

formas amastigotas/mL das cepa Y e Bolívia de *T. cruzi*, provenientes de cultura de células LLCMK₂ infectadas. Essa microplaca contendo células e parasitas foi incubada a 37°C por 3 horas em estufa de CO₂, com umidade de 95%. Posteriormente, foram adicionados Benzonidazol e ZnSO₄ nas seguintes concentrações: 5µg, 20µg, 100µg e 200µg /mL. Sendo essa placa novamente incubada durante 24hs. A leitura do ensaio foi realizada de acordo com a técnica descrita para a cultura de células não infectadas.

A avaliação foi realizada em triplicata para cada concentração de Benzonidazol e ZnSO₄. Como controle positivo (100% de atividade) foi utilizado apenas meio RPMI 1640 e o controle negativo (sem atividade) o meio com células e parasitas.

11) Avaliação tripanocida “in vitro” do Sulfato de Zinco sobre as formas amastigotas de T. cruzi

A avaliação sobre as formas amastigotas de *T. cruzi* foi realizada em placa de microtitulação de 96 poços contendo 5 x 10⁶ formas amastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* (Osakabe, 2004), provenientes de cultura de células LLCMK₂ infectadas, mantidas em garrafa com 5mL de meio RPMI 1640 completo (GIBCO). Essa microplaca foi incubada a 37°C por 3 horas em estufa de CO₂, com umidade de 95%. Após esse período, foram adicionados Benzonidazol e ZnSO₄ nas seguintes concentrações: 5µg, 20µg, 100µg e 200µg /mL. Sendo essa placa novamente incubada durante 24hs e em seguida analisada de acordo com a técnica descrita para a cultura de células não infectadas.

O ensaio tripanocida foi realizado em triplicata para cada concentração de Benzonidazol e ZnSO₄. Como Controle Positivo (100% de atividade) foi utilizado apenas

meio RPMI 1640 e como Controle Negativo (sem atividade) o meio com formas amastigotas.

12)Análise Estatística

Para a avaliação dos resultados obtidos no presente trabalho foram utilizados os testes estatísticos ANOVA fator único (One Way) complementado pela correlação do Teste de Tukey, e ANOVA fator duplo (Two Way) seguido do Teste de Bonferroni. A determinação do IC₅₀ e da curva sigmoidal dose-resposta foram utilizados como método estatístico para avaliar a significância da avaliação *in vitro*. Todos os testes estatísticos foram realizados por meio da ferramenta computacional GraphPad Prism, versão 3.02.

VI.RESULTADOS

1) Parasitemia

Pelo estudo do comportamento da curva parasitêmica, foi observado que a cepa Y apresentou período pré-patente de 3 dias, com pico de parasitemia no 7º dia após o inóculo das formas tripomastigotas, enquanto que para a cepa Bolívia, o período pré-patente foi de 5 dias, com pico parasitêmico no 14º dia.

Comparando a parasitemia de ambas as cepas, foi observado que os animais infectados com a cepa Bolívia apresentaram níveis parasitêmicos maiores do que os valores obtidos para os animais infectados com a cepa Y (Figura 1).

As fêmeas não prenhas e infectadas com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* (InPY e InPB) apresentaram valores referentes ao número máximo de parasitas, no pico parasitêmico maiores do que as fêmeas prenhas (IPY e IPB). Sendo essa diferença constatada estatisticamente por Teste ANOVA fator duplo seguido do Teste de Bonferroni, apenas entre os grupos da cepa Bolívia (InPB x IPB = $p < 0,05$). Nos grupos infectados com a cepa Y, as diferenças observadas não foram significativas.

Em relação à suplementação de Zn, foi observado que as fêmeas infectadas e que receberam suplementação (InPYZ, IPYZ, InPBZ e IPBZ) apresentaram redução na parasitemia quando comparado aos resultados obtidos de fêmeas infectadas e não suplementadas (InPY, IPY, InPB e IPB). No entanto, a redução foi estatisticamente significativa (ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni) apenas nos grupos de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e não prenhas (InPB x InPBZ = $p < 0,01$).

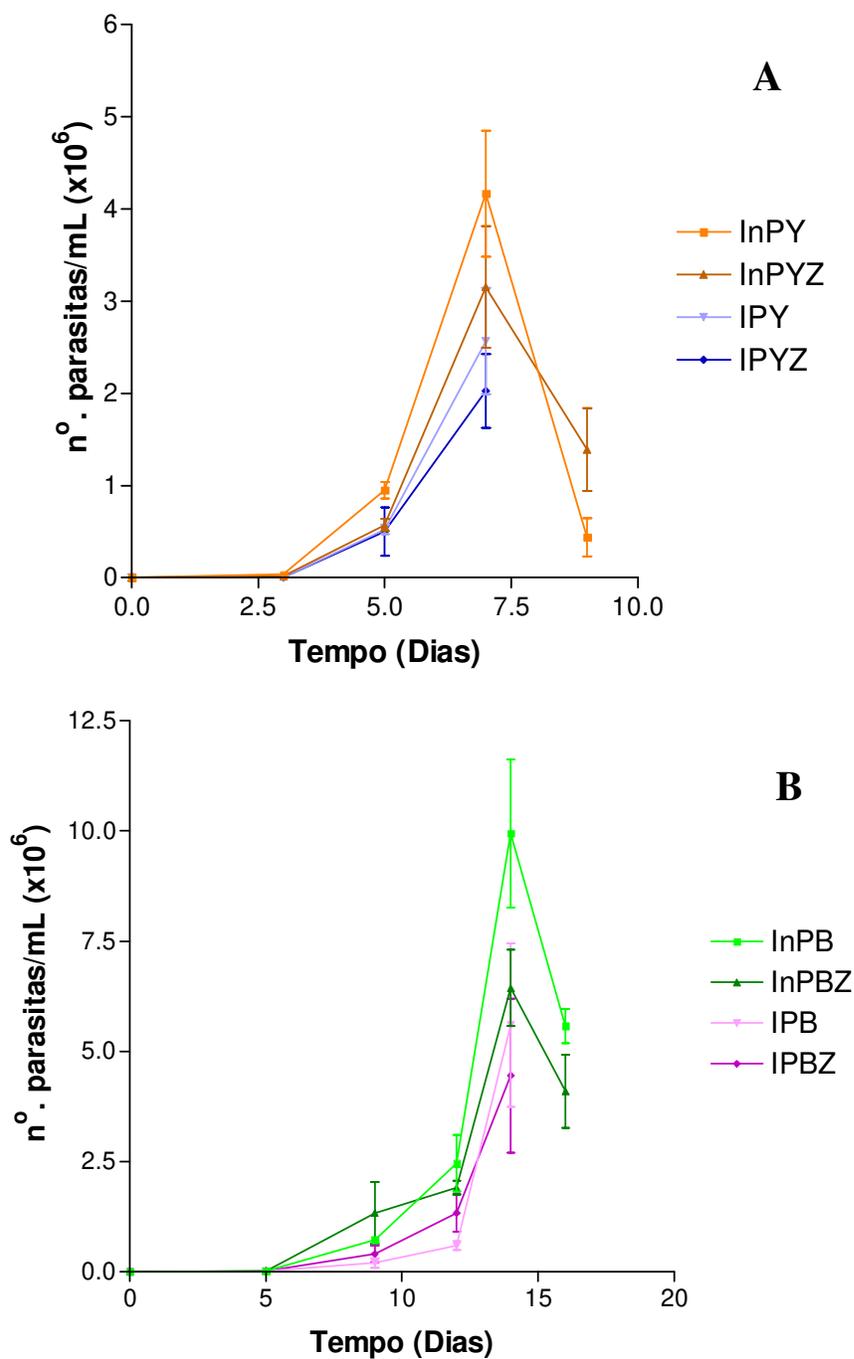


Figura 1. Variação do perfil parasitêmico durante o curso da infecção experimental, em fêmeas prenhas (n = 5) e não prenhas (n = 5) infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 tripomastigotas/mL das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *T. cruzi*, submetidas ou não a suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (* - $p < 0,05$) Redução significativa do número de parasitas entre os grupos InPB x IPB. (** - $p < 0,01$) Redução significativa do número de parasitas entre os grupos InPB x InPBZ. InPY – infectada não prena cepa Y; InPB – infectada não prena cepa Bolívia; InPYZ – infectada não

prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

2)Peso e medidas

2.1)Peso das Fêmeas não Prenhas

De acordo com os resultados foi observado que para esse parâmetro a infecção por *T. cruzi* não interferiu no peso dos grupos infectados [InPY – $42,86 \pm 1,48$ g; InPYZ – $44,75 \pm 0,72$ g; InPB – $44,46 \pm 1,84$ g; e InPBZ – $46,47 \pm 1,21$ g (valores referentes ao 19º. dia)], diante dos resultados apresentados pelos grupos controle (nInP – $43,15 \pm 1,36$ g e nInPZ – $41,70 \pm 3,01$ g) (Figura 2A).

Em relação à suplementação de Zn, foi verificado que a suplementação não determinou a alteração do peso das fêmeas em todos os grupos experimentais.

2.2)Peso das Fêmeas Prenhas

Nas fêmeas prenhas, os resultados obtidos foram similares aos resultados apresentados pelas fêmeas não prenhas. Certamente, as fêmeas prenhas ganharam mais peso do que as fêmeas não prenhas devido à gestação.

O peso do grupo infectado IPY ($74,80 \pm 3,11$ g - valor referente ao 19º. dia) não apresentou diferenças em relação ao grupo controle nIP ($75 \pm 6,44$ g) (Figura 2B). Por outro lado, o peso das fêmeas IPB ($84 \pm 9,61$ g) foi numericamente maior do que o encontrado para

os grupos (nIP e IPY), embora não estatisticamente significativo. Sendo assim, a infecção não influenciou no ganho de peso das fêmeas infectadas.

Em relação à suplementação, foi observado que a suplementação não interferiu no peso das fêmeas do grupo controle (nIPZ – $69,2 \pm 13,33$ g) em relação ao grupo controle não suplementado (nIP) (Figura 2B).

Quando foram comparados os resultados obtidos dos grupos infectados suplementados (IPYZ – $78,20 \pm 4,81$ g e IPBZ – $87,80 \pm 8,04$ g), com o grupo controle suplementado (nIPZ), foi verificado que a suplementação pode ter sido um dos fatores que determinaram o aumento de peso das fêmeas infectadas, sendo que, as fêmeas (IPBZ) apresentaram maior ganho de peso do que as fêmeas (IPYZ). No entanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, de acordo com ANOVA fator único seguido do Teste de Tukey.

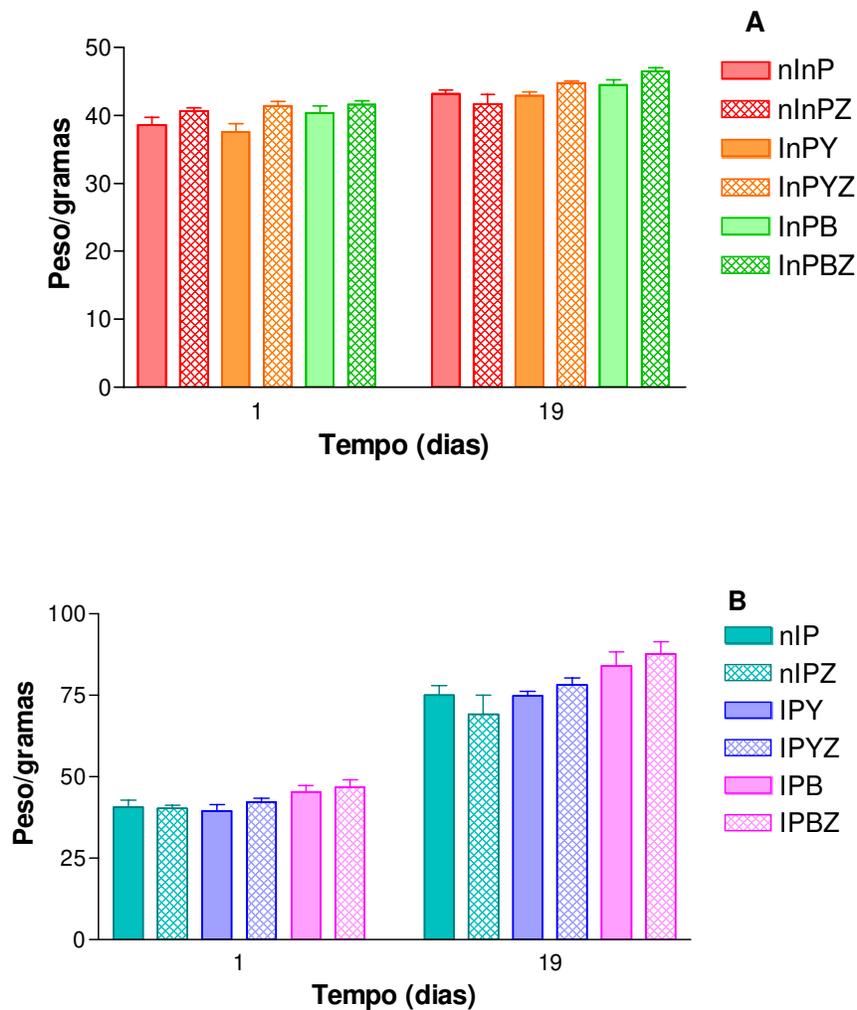


Figura 2. Avaliação do peso das fêmeas não prenhas (n = 5 - A) e prenhas (n = 5 - B), no dia do acasalamento (1º dia) e no 19º dia de gestação, infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de zinco. nInP - não infectada não prenha; nInPZ - não infectada não prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; nIP - não infectada prenha; nIPZ - não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; InPY - infectada não prenha cepa Y; InPB - infectada não prenha cepa Bolívia; InPYZ - infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY - infectada prenha cepa Y; IPB - infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ - infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

2.3)Peso dos Fetos

De acordo com a Figura 3, foi verificado que nos grupos infectados (IPY – $1,22\pm 0,15\text{g}$ e IPB – $1,14\pm 0,34\text{g}$), o peso dos fetos foi menor do que no grupo controle (nIP – $1,31\pm 0,21\text{g}$), evidenciando que a infecção por *T. cruzi* influenciou nesse parâmetro, embora essa diferença tenha sido apenas numérica, não apresentando significância estatística (ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni).

Quando os grupos experimentais foram submetidos à suplementação de Zn, foi observado que o peso dos fetos das fêmeas dos grupos (nIPZ – $1,32\pm 0,21\text{g}$, IPYZ – $1,29\pm 0,14\text{g}$ e IPBZ – $1,29\pm 0,26\text{g}$) não foi alterado, apresentando resultados numéricos médios similares ao grupo controle não suplementado (nIP).

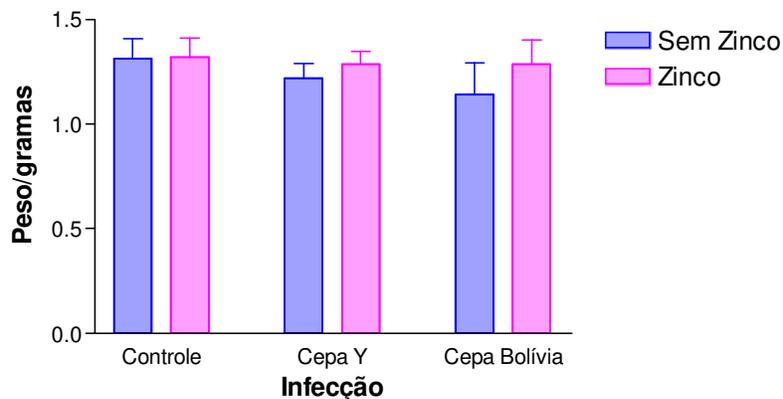


Figura 3. Avaliação do peso (g) dos fetos ($n = 5/\text{fêmea}$) de fêmeas no 19º dia de gestação. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco.

2.4) *Peso da Placenta*

De acordo com os dados obtidos e representados na Figura 4, foi observado que as placentas dos grupos infectados por *T. cruzi* (IPY – $0,172 \pm 0,008$ g e IPB – $0,180 \pm 0,037$ g), não apresentaram alterações significativas no peso em relação ao grupo controle (nIP – $0,184 \pm 0,009$ g).

Nesse mesmo sentido, foi observado que a suplementação de Zn não promoveu alterações significativas entre os grupos experimentais.

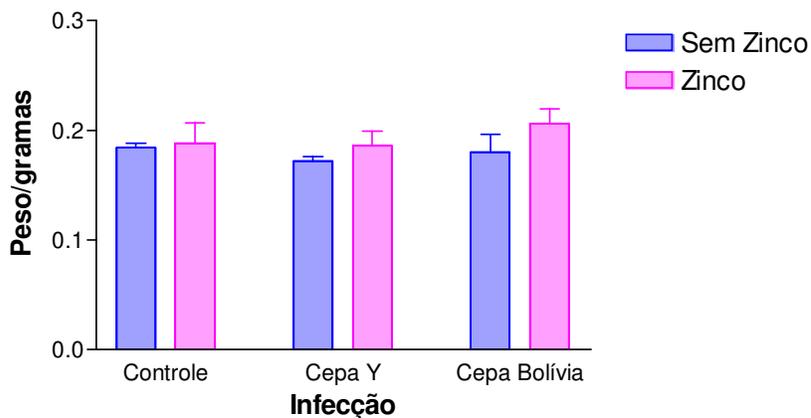


Figura 4. Avaliação do peso (g) das placentas (n = 5/fêmea n = 5) de fêmeas no 19º dia de gestação. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20 mg/Kg de Sulfato de Zinco.

2.5) *Comprimento dos Fetos*

Em relação ao comprimento dos fetos (Figura 5), foi possível verificar que nos grupos infectados (IPY – $20,97 \pm 1,34$ mm e IPB – $20,40 \pm 2,5$ mm) a infecção pelo *T. cruzi* não foi um fator limitante para o desenvolvimento dos fetos, pois os valores foram similares ao grupo controle (nIP – $21,45 \pm 1,62$ mm).

Após a suplementação com Zn foi observado que os grupos (nIPZ – $21,93 \pm 1,0\text{mm}$; IPYZ – $21,81 \pm 1,45\text{mm}$ e IPBZ – $21,87 \pm 2,73\text{mm}$) não apresentaram alterações significativas no comprimento dos fetos em relação aos grupos não suplementados (nIP, IPY e IPB).

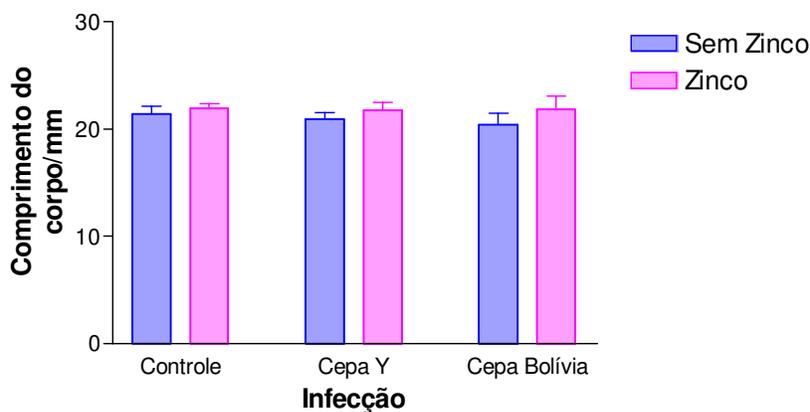


Figura 5. Avaliação do comprimento corporal dos fetos ($n = 5/\text{fêmea } n = 5$) de fêmeas no 19º dia de gestação. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco.

3) Avaliação Pós-Natal dos Neonatos

O peso e o comprimento pós-natal dos neonatos dos grupos infectados foram acompanhados até o 7º. dia de vida para os neonatos de fêmeas infectadas com a cepa Y, e até o 14º. dia para os neonatos de fêmeas pertencentes ao grupo da cepa Bolívia. Essa diferença de dias foi necessária devido ao tempo de sobrevivência materna.

3.1) Peso dos Neonatos

Entre o grupo controles (nIP e nIPZ), foi verificado que a suplementação de Zn durante o período gestacional nesses grupos, não alterou o peso dos neonatos após o nascimento.

De acordo com a Figura 6, foi observado que a infecção materna por *T. cruzi* durante o período gestacional influenciou no peso dos neonatos. Pois os neonatos de fêmeas infectadas com a cepa Y (IPY) e de fêmeas infectadas suplementadas (IPYZ), demonstraram redução significativa ($p < 0,05$ – ANOVA fator único e Teste de Tukey) quando comparados com os dados dos grupos controles (nIP e nIPZ). Por outro lado, o peso dos neonatos de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia (IPB) e suplementadas (IPBZ) também apresentaram redução do peso, entretanto essa alteração não foi significativa.

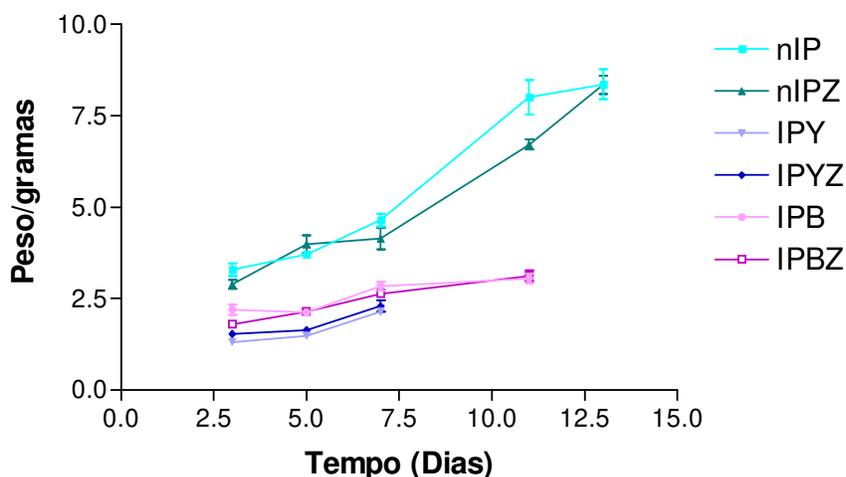


Figura 6. Avaliação do peso (g) dos neonatos ($n = 5$ / fêmeas) das fêmeas dos grupos experimentais 3 dias após o nascimento. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (* - $p < 0,05$) Diferença significativa entre os grupos (nIP x IPY; nIP x IPYZ; nIPZ x IPY; nIPZ x IPYZ). nIP – não infectada prenha; nIPZ – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa

Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

3.2) Comprimento dos Neonatos

Analisando os resultados referentes ao comprimento corporal dos grupos infectados (IPY e IPB) foi verificado que a infecção alterou o desenvolvimento dos neonatos de fêmeas infectadas pelo *T. cruzi*, principalmente nos neonatos originados de fêmeas infectadas com a cepa Y, entretanto esses resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 7).

Em relação à suplementação com Zn nos grupos experimentais, foi observado que a suplementação de Zn não influenciou no comprimento corporal dos neonatos após o nascimento.

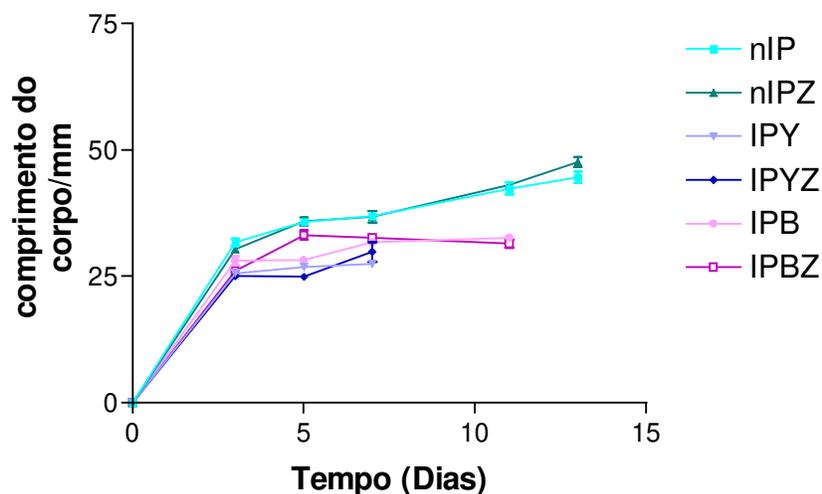


Figura 7. Avaliação do comprimento corporal dos neonatos (n = 5/fêmea n= 5) oriundos dos diferentes grupos experimentais após o nascimento. nIP – não infectada prenha; nIPZ – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

4) Mortalidade das Fêmeas

De acordo com os resultados da Figura 8, as taxas mortalidade das fêmeas infectadas (InPY, IPY, InPB e IPB) e infectadas suplementadas (InPYZ, IPYZ, InPBZ e IPBZ) foram significativamente maiores ($p < 0,05$ – ANOVA fator único e Teste de Tukey) do que a taxa dos grupos controle não infectados (nInP, nIP, nInPZ e nIPZ).

Além disso, foi observado que a suplementação de Zn não aumentou o tempo de sobrevivência dos grupos infectados com ambas as cepas de *T. cruzi*, pois esses grupos apresentaram alta taxa de mortalidade, em relação aos grupos controle.

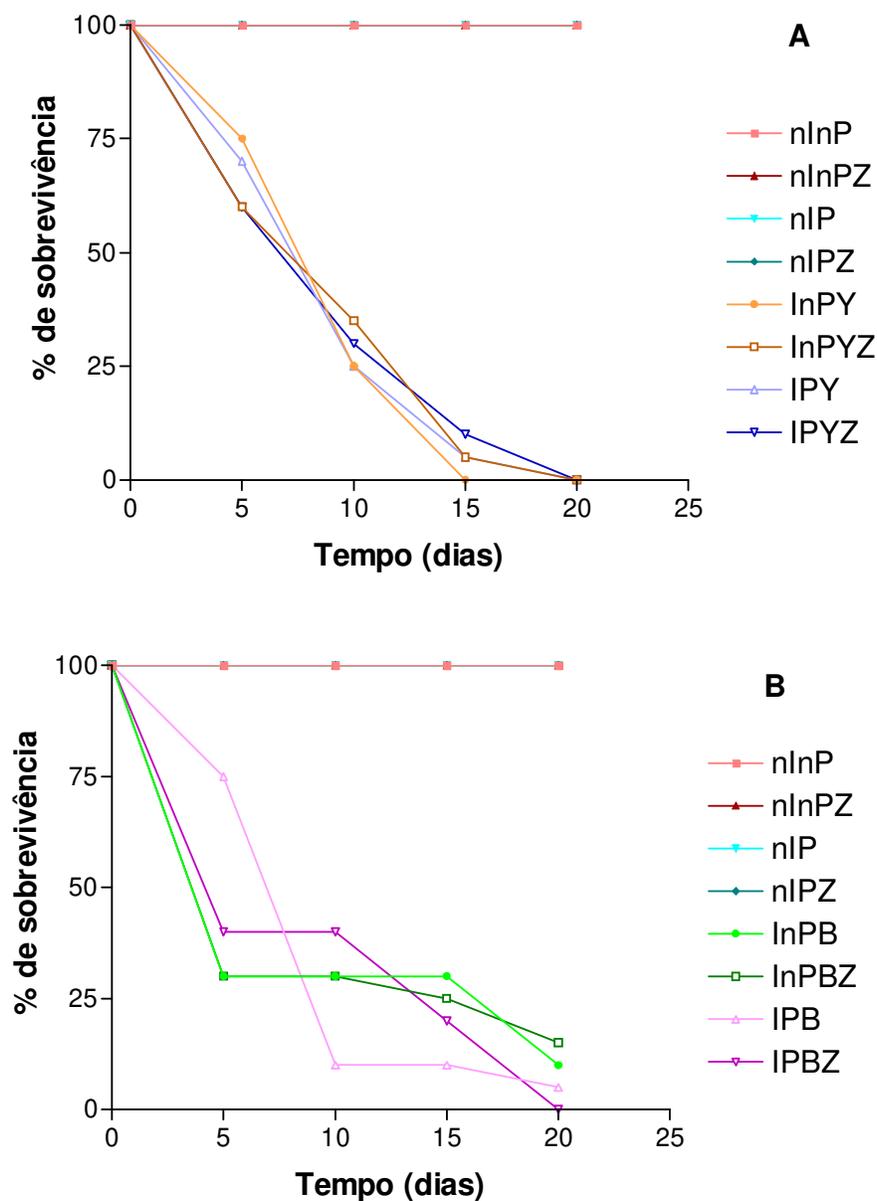


Figura 8. Porcentagem de sobrevivência das fêmeas não infectadas ($n = 5$) e das fêmeas infectadas ($n = 5$) com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y(A) e Bolívia (B) de *T. cruzi*, avaliada dias após a infecção. Suplementadas ou não com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco diariamente. (* - $p < 0,05$) Redução significativa para todos os grupos infectados em relação aos grupos controle. nInP - não infectada não prenha; nInPZ - não infectada não prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; nIP - não infectada prenha; nIPZ - não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; InPY - infectada não prenha cepa Y; InPB - infectada não prenha cepa Bolívia; InPYZ - infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; InPBZ - infectada não prenha

cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

5) Histologia

5.1) Análise do Parasitismo tecidual

Tabela 1. Análise da intensidade do parasitismo tecidual no Coração, Baço e Fígado de *Mus musculus* infectados com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* suplementadas com Zn.

Grupos	n°. de animais	Dias de infecção	Número médio de ninhos nos órgãos/animal ¹ ± DP ²		
			Coração	Baço	Fígado
Fêmeas não prenhas					
INPY	05	07	77±53,34***	354±56,24***	43±28,27***
INPYZ	05	07	54±38,32	335±57,88***	22±8,05***
INPB	05	14	653±234,68***	04±1,3***	37±25,92*
INPBZ	05	14	54±49,83***	02±1,74***	03±2,24*
Fêmeas Prenhas					
IPY	05	07	22±5,26**	343±118,9***	124±46,61*/***
IPYZ	05	07	19±8,54	279±82,61***	120±43,76***
IPB	05	14	98±46,66**/***	09±4,64***	55±27,24*
IPBZ	05	14	29±10,80**	02±1,59***	06±4,99*/***

1 - média obtida do total de ninhos encontrados em 5 animais.

2 - DP – desvio padrão.

* (p<0,05) Diferença significativa no parasitismo do fígado entre os grupos (InPB x InPBZ; IPB x IPBZ; IPY x IPB).

** (p<0,01) Diferença significativa no parasitismo do coração entre os grupos (IPB x IPBZ; IPY x IPB).

*** (p<0,001) Diferença significativa no parasitismo do coração entre os grupos (InPB x InPBZ; InPY x InPB; InPB x IPB) no parasitismo do baço entre os grupos (InPY x InPB; InPYZ x InPBZ; IPY x IPB; IPYZ x IPBZ), no parasitismo do fígado entre os grupos (IPYZ x IPBZ; InPY x IPY; InPYZ x IPYZ).

InPY – infectada não prenha cepa Y; InPB – infectada não prenha cepa Bolívia; InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

5.1.1)Coração

Comparando-se o parasitismo tecidual entre as fêmeas infectadas com a cepa Y (INPY e IPY) e as fêmeas infectadas com a cepa Bolívia (INPB e IPB) foi verificado que nas fibras cardíacas o número de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* foi maior no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia, de acordo com ANOVA fator duplo seguido do Teste de Bonferroni, resultando em ($p < 0,001$) para InPY x InPB e ($p < 0,01$) para IPY x IPB (Tabela 1).

Entre as fêmeas prenhas e não prenhas, foi observado que a prenhez reduziu o número de ninhos nas fibras cardíacas de todos os grupos experimentais. Por outro lado, essa redução foi significativa apenas para as fêmeas infectadas com a cepa Bolívia (InPB x IPB = $p < 0,001$).

Em relação à suplementação de Zn, foi verificada uma redução na quantidade de ninhos em ambas as cepas, no entanto apenas os grupos de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia apresentaram redução significativa (InPB x InPBZ = $p < 0,001$; IPB x IPBZ = $p < 0,01$).

Em todos os grupos, não foi possível observar alterações patológicas nas fibras cardíacas (Figura 9).

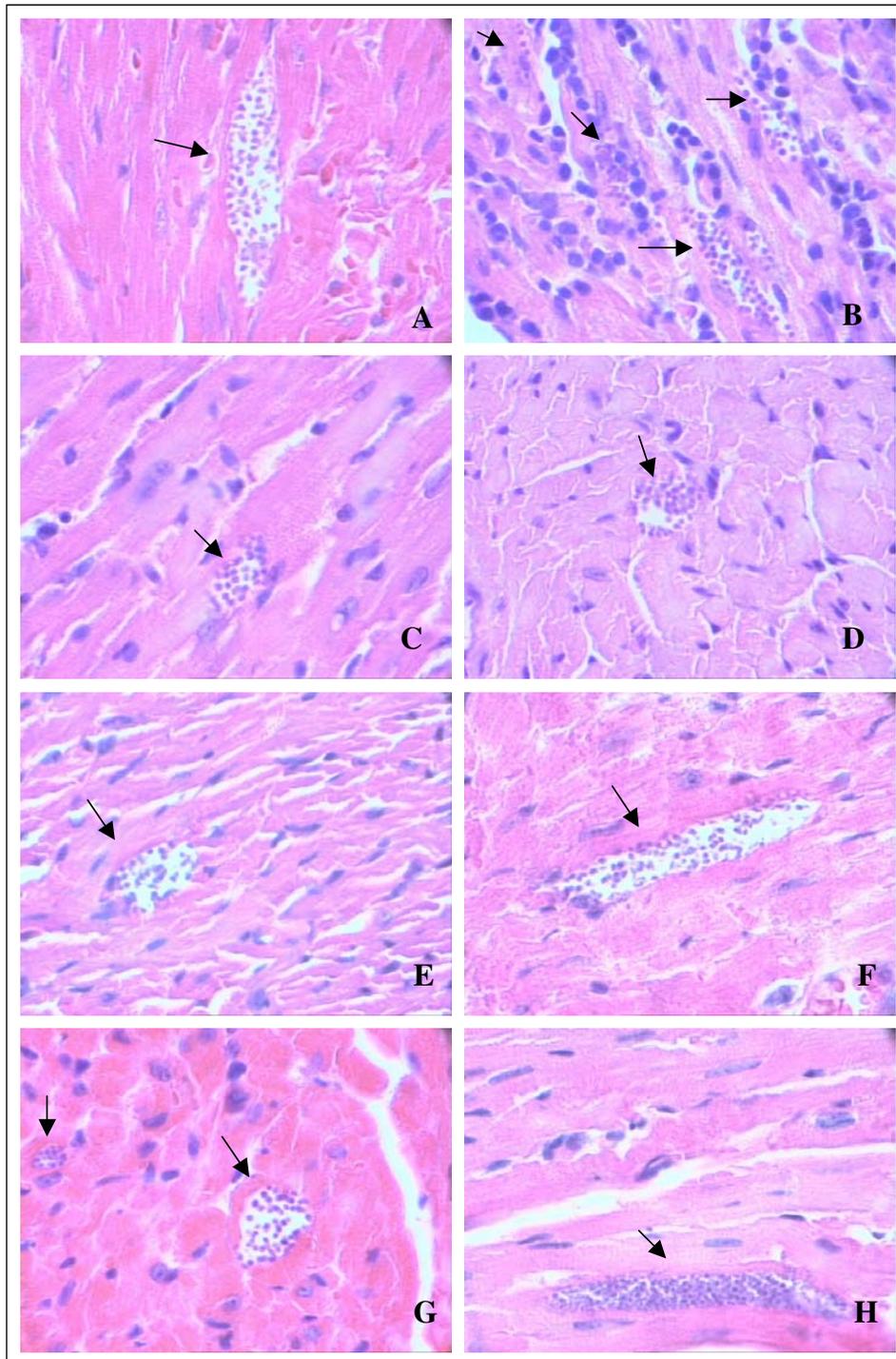


Figura 9. Fotomicrografias das fibras cardíacas de fêmeas dos grupos experimentais. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. Notar os ninhos de

formas amastigotas indicados pelas setas. (A) InPY – infectada não prenha cepa Y; (B) InPB – infectada não prenha cepa Bolívia; (C) InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (D) InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; (E) IPY– infectada prenha cepa Y; (F) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (G) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco e (H) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (1000X).

5.1.2)Baço

De acordo com a comparação dos resultados obtidos entre as cepas Y (InPY, InPYZ, IPY e IPYZ) e Bolívia (InPB, InPBZ, IPB e IPBZ), demonstrou que o baço foi intensamente parasitado nos grupos de fêmeas infectadas pela cepa Y ($p < 0,001$ – ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni), apresentando numerosos ninhos de formas amastigotas tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha do tecido (Tabela 1).

Na Tabela 1, foi observado que as fêmeas prenhas e não prenhas, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Em todos os grupos experimentais foi verificado que a suplementação de Zn reduziu o número de ninhos no baço (ANOVA fator duplo).

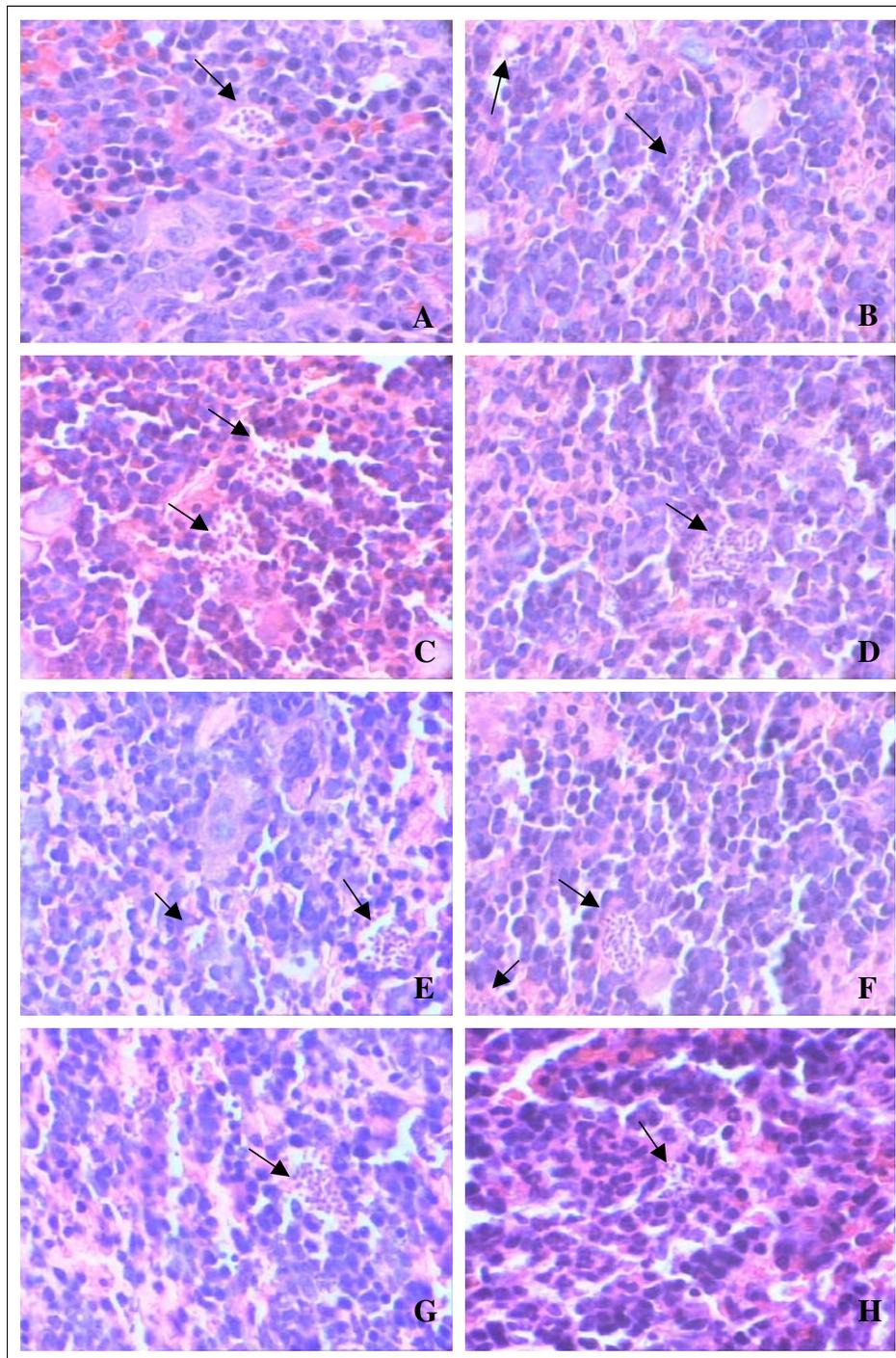


Figura 10. Fotomicrografias do baço de fêmeas dos grupos experimentais. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*, submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) InPY – infectada não prenha cepa Y; (B) InPB – infectada

não prenha cepa Bolívia; (C) InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (D) InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; (E) IPY– infectada prenha cepa Y; (F) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (G) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco e (H) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (1000X).

5.1.3)Fígado

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, foi observado que o fígado de todos os grupos infectados apresentaram ninhos do parasita. Entretanto esse parasitismo foi significativamente maior nos grupos infectados pela cepa Y do que nos grupos infectados com a cepa Bolívia, principalmente entre as fêmeas prenhas (IPY x IPB = $p < 0,05$; IPYZ x IPBZ = $p < 0,001$ – ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni).

Quando foram comparados os resultados obtidos entre as fêmeas não prenhas e as fêmeas prenhas, foi verificado que a gestação aumentou a intensidade do parasitismo tecidual em todos os grupos. Sendo que, os grupos (IPY e IPYZ) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de ninhos de formas amastigotas em relação aos grupos (InPY e InPYZ).

Em relação à suplementação de Zn, foi observado que as fêmeas infectadas com ambas as cepas (InPYZ, IPYZ, InPB e IPBZ), apresentaram menor número de ninhos de formas amastigotas no fígado do que as fêmeas que não receberam a suplementação. Entretanto, essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas nos grupos infectados com a cepa Bolívia (InPB x InPBZ; IPB x IPBZ).

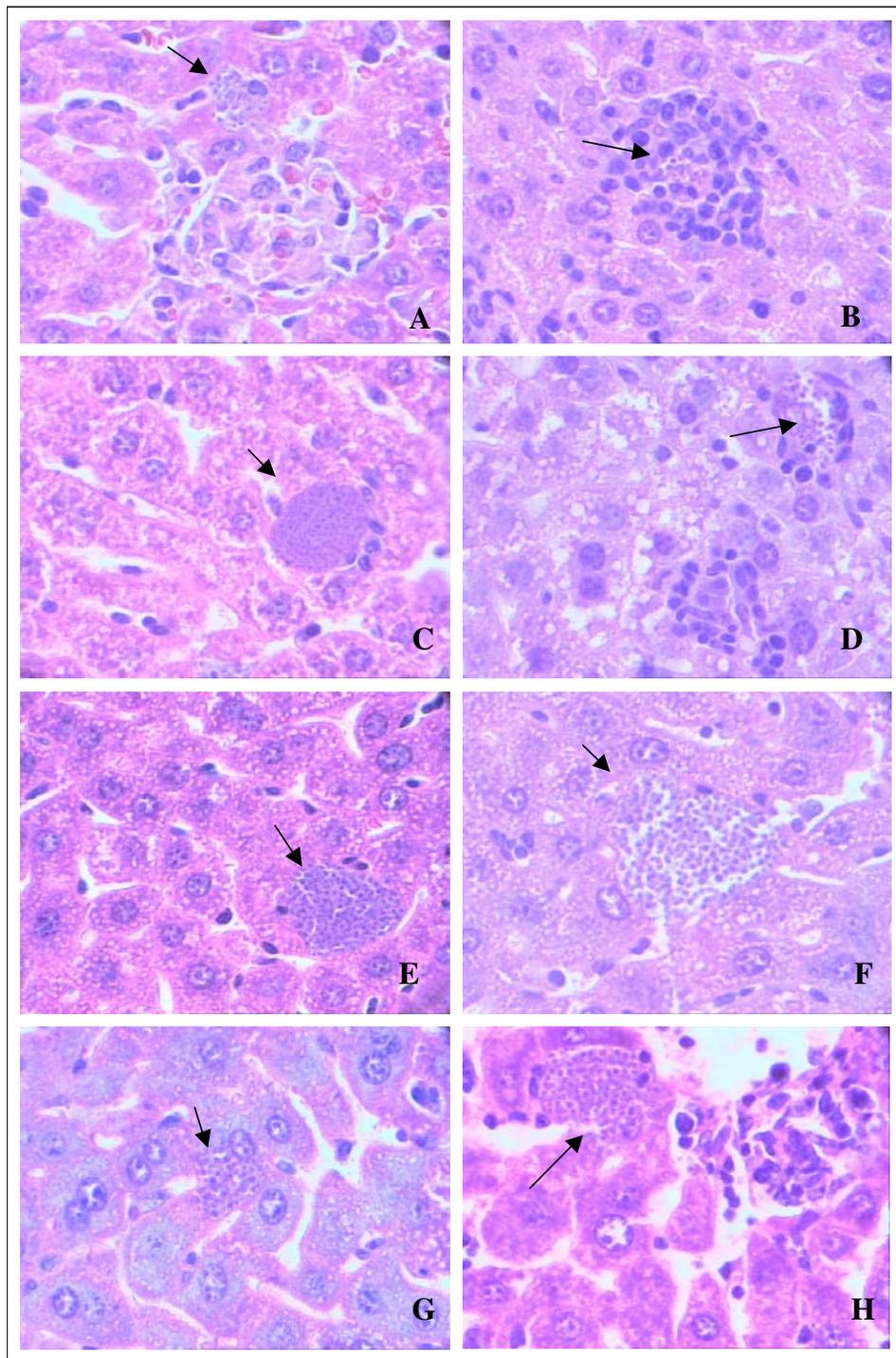


Figura 11. Fotomicrografias do fígado de fêmeas dos grupos experimentais. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) InPY – infectada não prenha cepa Y; (B) InPB – infectada

não prenha cepa Bolívia; (C) InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (D) InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; (E) IPY– infectada prenha cepa Y; (F) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (G) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco e (H) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (1000X).

5.1.4) Placenta

Tabela 2. Análise da intensidade do parasitismo da placenta de *Mus musculus* infectados com 4×10^4 formas tripomastigotas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* e suplementados com Zn.

Grupos	nº. de animais	Dias de infecção	Camadas da placenta/		
			Número médio de ninhos /animal* \pm DP**		
			Decídua	Esponjosa	Labiríntica
IPY	5	7	63 \pm 49,54***	107 \pm 19,85***	118 \pm 25,10***
IPYZ	5	7	23 \pm 14,01	30 \pm 10,27	36 \pm 14,26
IPB	5	14	1588 \pm 265,18***	1319 \pm 577,6***	428 \pm 91,70***
IPBZ	5	14	71 \pm 26,76***	49 \pm 15,46***	45 \pm 19,35***

*média de 5 animais, contendo 5 placentas cada animal.

** DP – desvio padrão

*** (p<0,001) Diferença significativa na camada decídua entre os grupos (IPY x IPB; IPB x IPBZ), na camada esponjosa entre os grupos (IPY x IPB; IPB x IPBZ), na camada labiríntica entre os grupos (IPY x IPB; IPB x IPBZ).

IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

As placentas dos animais infectados com as cepas Y (IPY) e Bolívia (IPB) de *T. cruzi* foram analisadas histologicamente, com intuito de verificar a incidência de ninhos das formas amastigotas (Tabela 2). De acordo com essa análise, foi observado que as placentas das fêmeas infectadas com a cepa Bolívia (IPB) apresentaram intenso parasitismo nas três camadas teciduais, sendo mais acentuado na camada decídua (Figura 12), seguido da esponjosa (Figura 13) e labiríntica (Figura 14). Em relação à cepa Y (IPY), as placentas

apresentaram parasitas em todas as camadas placentárias. Entretanto, o parasitismo placentário foi maior na última camada, ou seja, na camada labiríntica (Tabela 2).

Comparando-se os resultados obtidos entre as cepas, foi verificado que o grupo de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e não suplementada (IPB) apresentou maior número de ninhos de formas amastigotas ($p < 0,001$ – ANOVA fator único e Teste de Tukey) em todas as camadas placentárias, quando comparado com os resultados obtidos para a cepa Y (IPY).

A suplementação de Zn reduziu o número de ninhos em todas as camadas placentárias dos grupos experimentais. No entanto, essa redução foi significativa ($p < 0,001$) apenas nos grupos da cepa Bolívia (IPB x IPBZ).

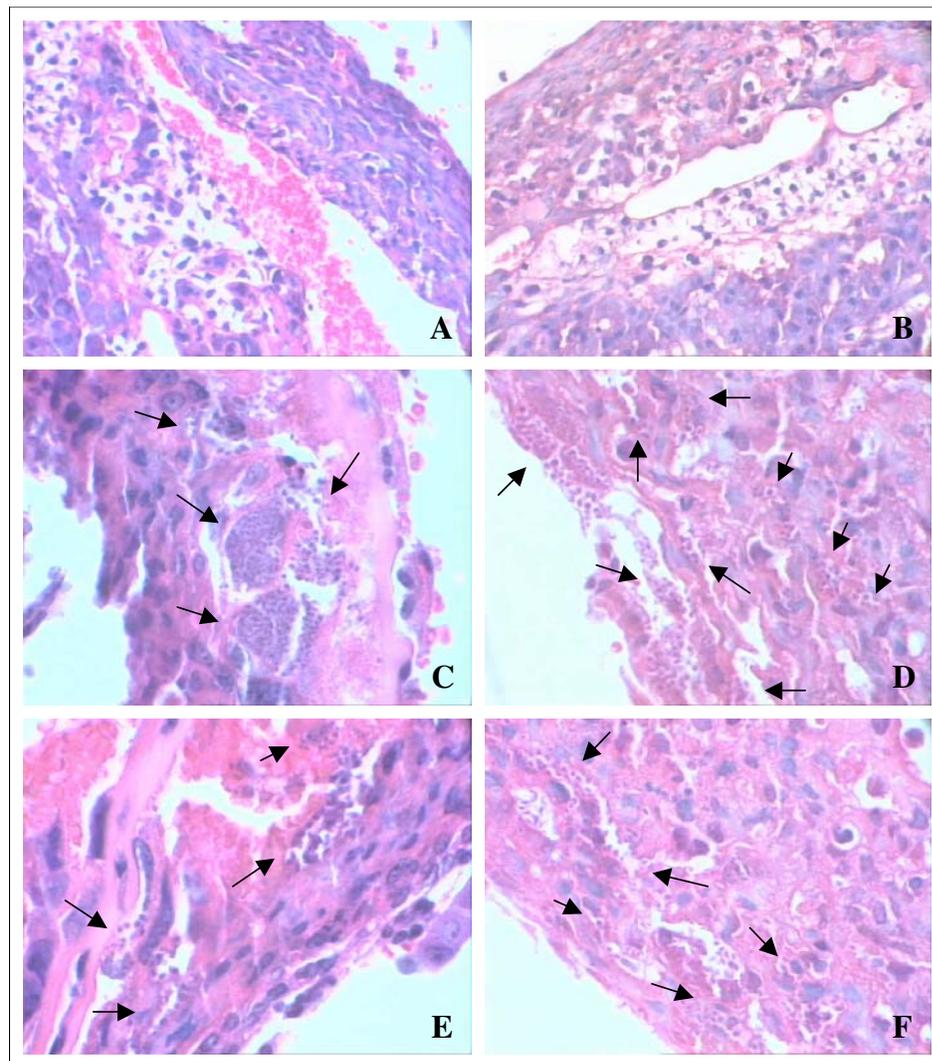


Figura 12. Fotomicrografias da camada decídua da placenta de fêmeas dos diferentes grupos experimentais. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) nIP (400X) – não infectada prenha; (B) nIPZ (400X) – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; (C) IPY – infectada prenha cepa Y; (D) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (E) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (1000X).

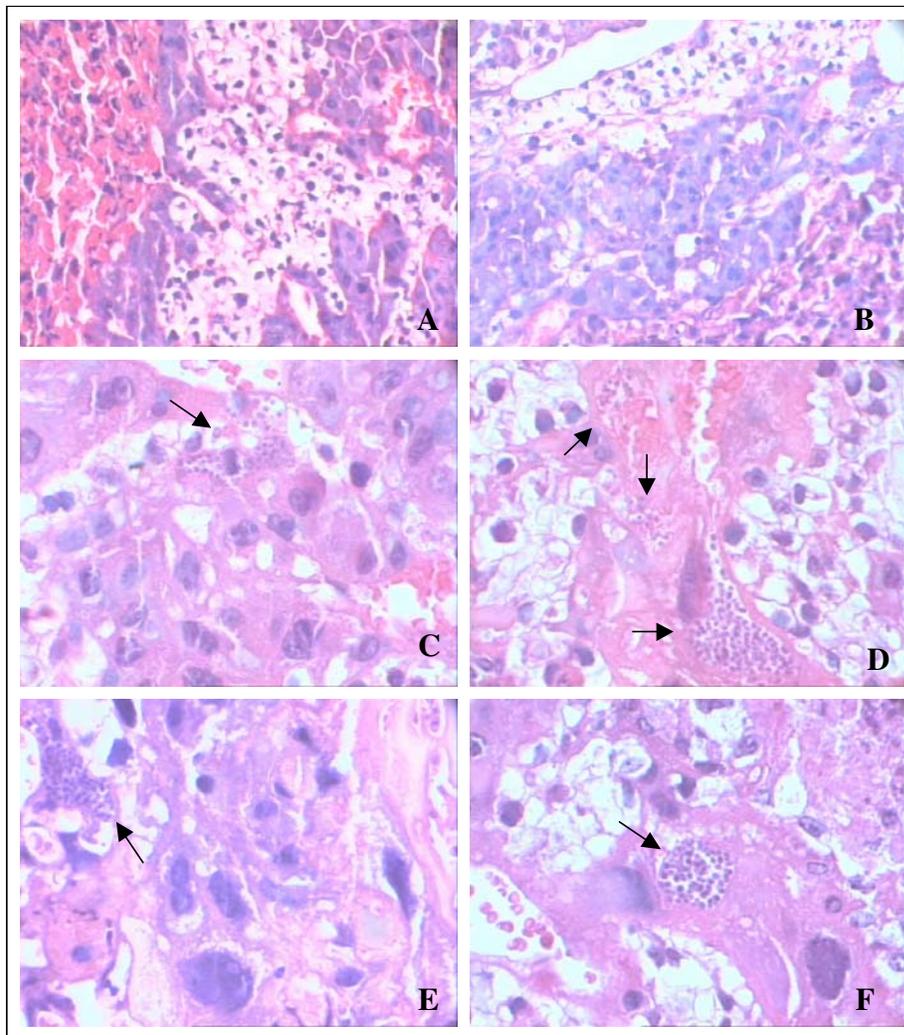


Figura 13. Fotomicrografias da camada esponjosa da placenta de fêmeas dos diferentes grupos experimentais.

As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) nIP (400X) – não infectada prenha; (B) nIPZ (400X) – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; (C) IPY – infectada prenha cepa Y; (D) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (E) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (1000X).

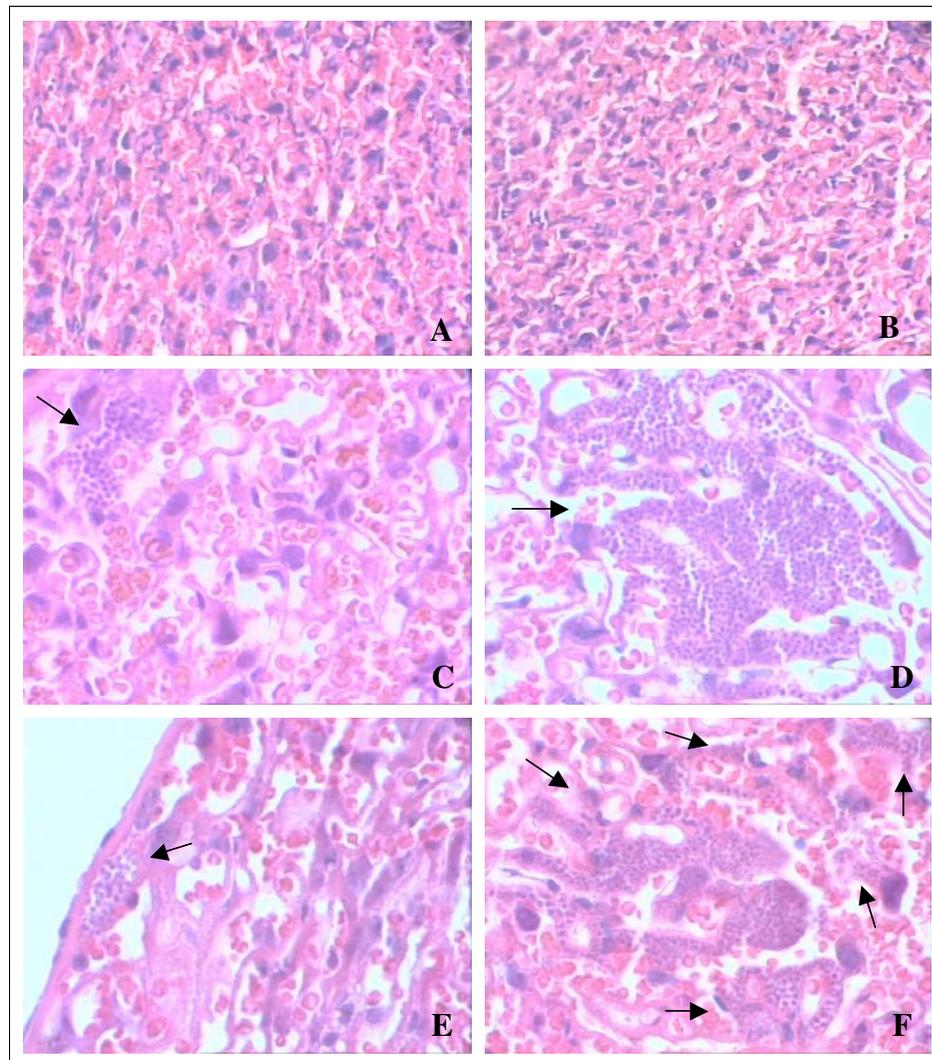


Figura 14. Fotomicrografias da camada labiríntica da placenta de fêmeas dos diferentes grupos experimentais.

As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/kg de Sulfato de Zinco. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) nIP (400X) – não infectada prenha; (B) nIPZ (400X) – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; (C) IPY – infectada prenha cepa Y; (D) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (E) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (1000X).

5.1.5)Fetos e neonatos

De acordo com a análise histológica dos cortes fetais (Figura 15) e neonatais, não foram observados ninhos de formas amastigotas nos tecidos dos diferentes grupos experimentais (IPY, IPYZ, IPB e IPBZ). As possíveis alterações histopatológicas dos cortes fetais e neonatais não foram analisadas no presente trabalho.

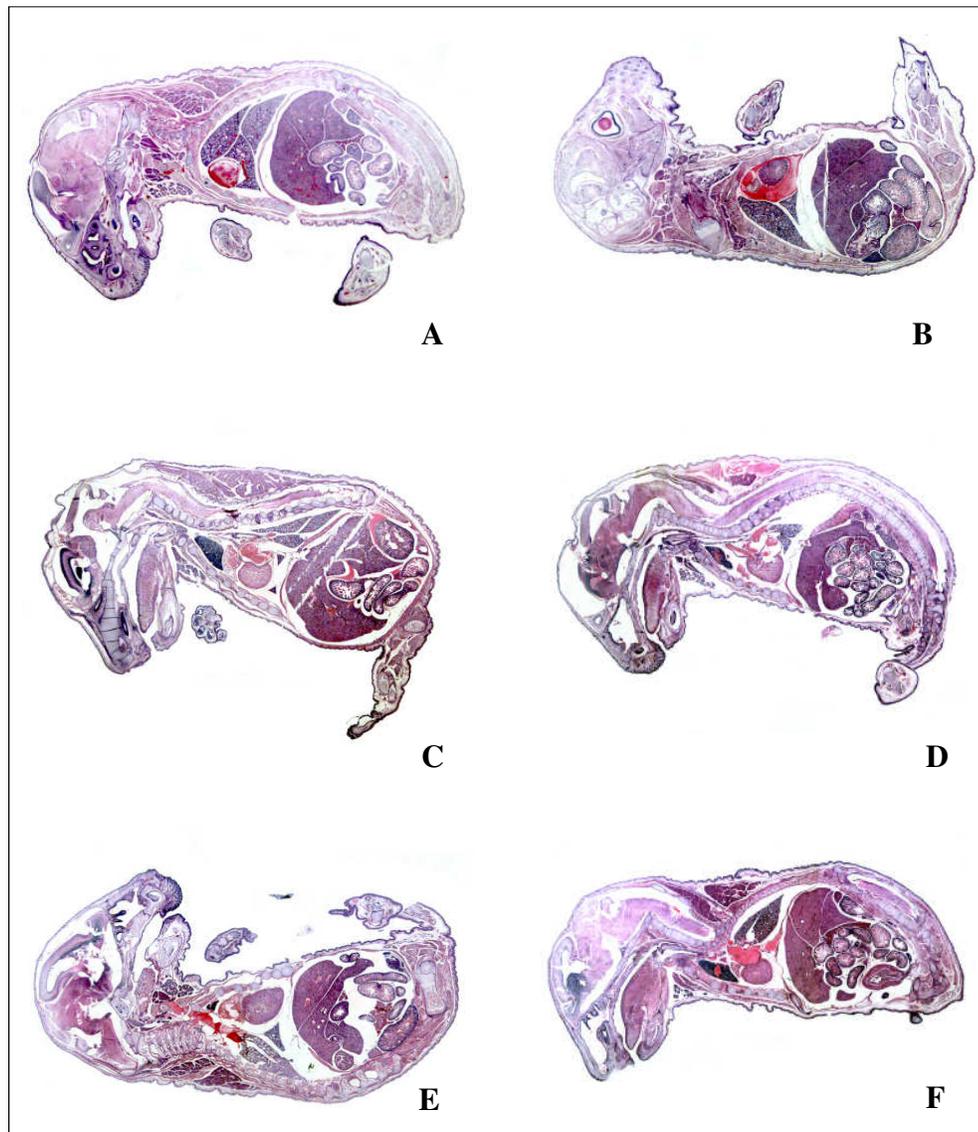


Figura 15. Imagens dos fetos de fêmeas dos grupos experimentais no 19º dia de prenhez. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/kg de Sulfato de Zinco. (A) nIP – não infectada prenha; (B) nIPZ – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; (C) IPY – infectada prenha cepa Y; (D) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (E) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Imagens capturadas na Lupa Leica MZ12. Hematoxilina e eosina (8X).

5.2)Análise de Processos Inflamatórios

5.2.1)Coração

O coração dos grupos controles (nInP, nInPZ, nIP e nIPZ) apresentou musculatura bem organizada e os núcleos visíveis e alongados, com dois ou mais nucléolos, e ausência de infiltrados inflamatórios (Figura 16A e B; Figura 17A e B).

Quando comparamos as fibras cardíacas dos grupos controle (nInP, nInPZ, nIP e nIPZ) e dos grupos infectados (InPY, InPYZ, InPB, InPBZ, IPY, IPYZ, IPB e IPBZ), foi verificado que a infecção favoreceu o recrutamento de células inflamatórias para os tecidos infectados.

Nos animais infectados com a cepa Y (InPY, InPYZ, IPY e IPYZ), foi visualizada a presença de infiltrado inflamatório difuso e discreto, sem a formação de focos inflamatórios (Figura 16C e E; Figura 17C e E).

No entanto, na região atrial do coração das fêmeas infectadas com a cepa Bolívia (InPB, InPBZ, IPB e IPBZ), foi verificada a presença de miocardite focal e difusa com infiltrado inflamatório mononuclear mais intenso em relação à parede dos ventrículos (Figura 16D e F; Figura 17D e F).

Histologicamente foi observado que as fêmeas prenhas infectadas (IPY e IPB) e as fêmeas prenhas infectadas suplementadas (IPYZ e IPBZ) apresentaram processo inflamatório difuso discreto e ocasionalmente formando focos. No entanto, as fêmeas prenhas e não prenhas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas (InPBZ e IPBZ), a miocardite foi mais discreta do que nas fêmeas não suplementadas. Em relação à cepa Y (InPYZ e IPYZ), a suplementação de Zn não alterou a intensidade de células inflamatórias nas fibras cardíacas.

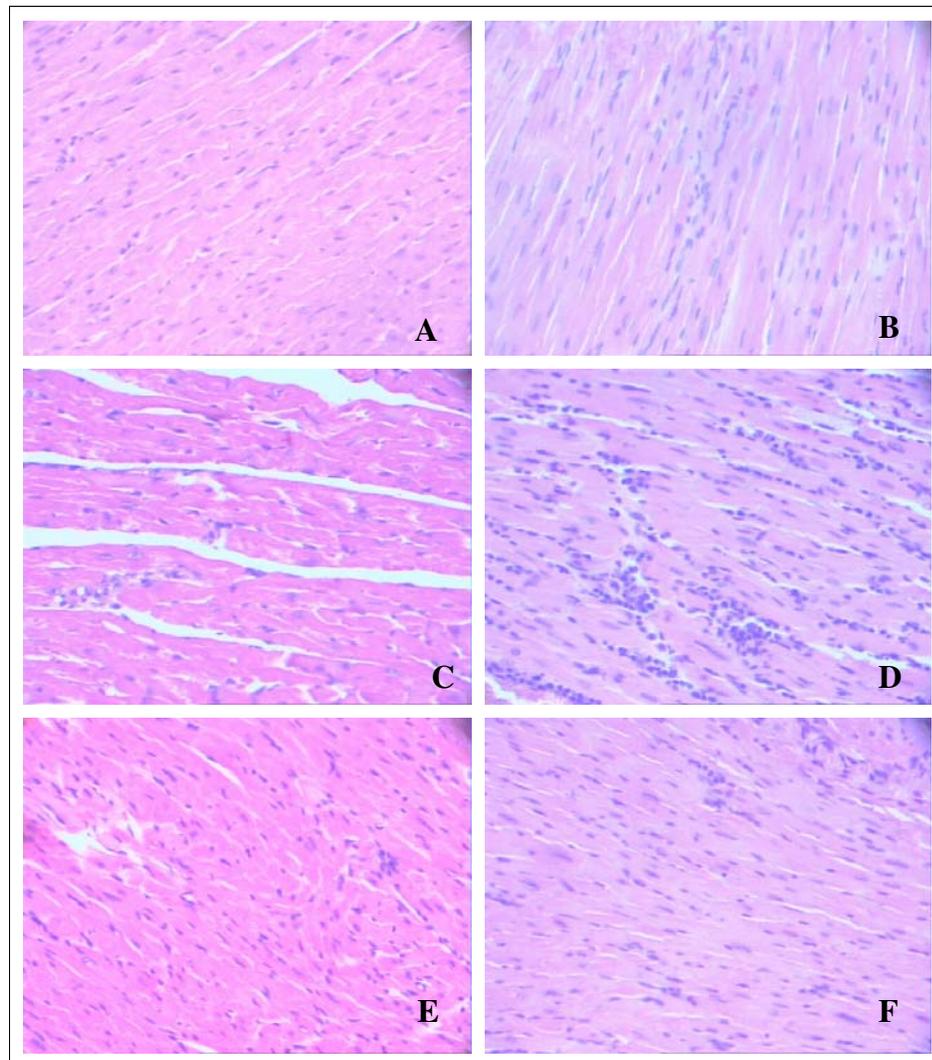


Figura 16. Fotomicrografias das fibras cardíacas de fêmeas não prenhas, demonstrando a intensidade de infiltrados inflamatórios. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (A) nInP – não infectada e não prenha; (B) nInPZ - não infectada e não prenha e suplementada; (C) InPY – infectada não prenha cepa Y; (D) InPB – infectada não prenha cepa Bolívia; (E) InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (400X).

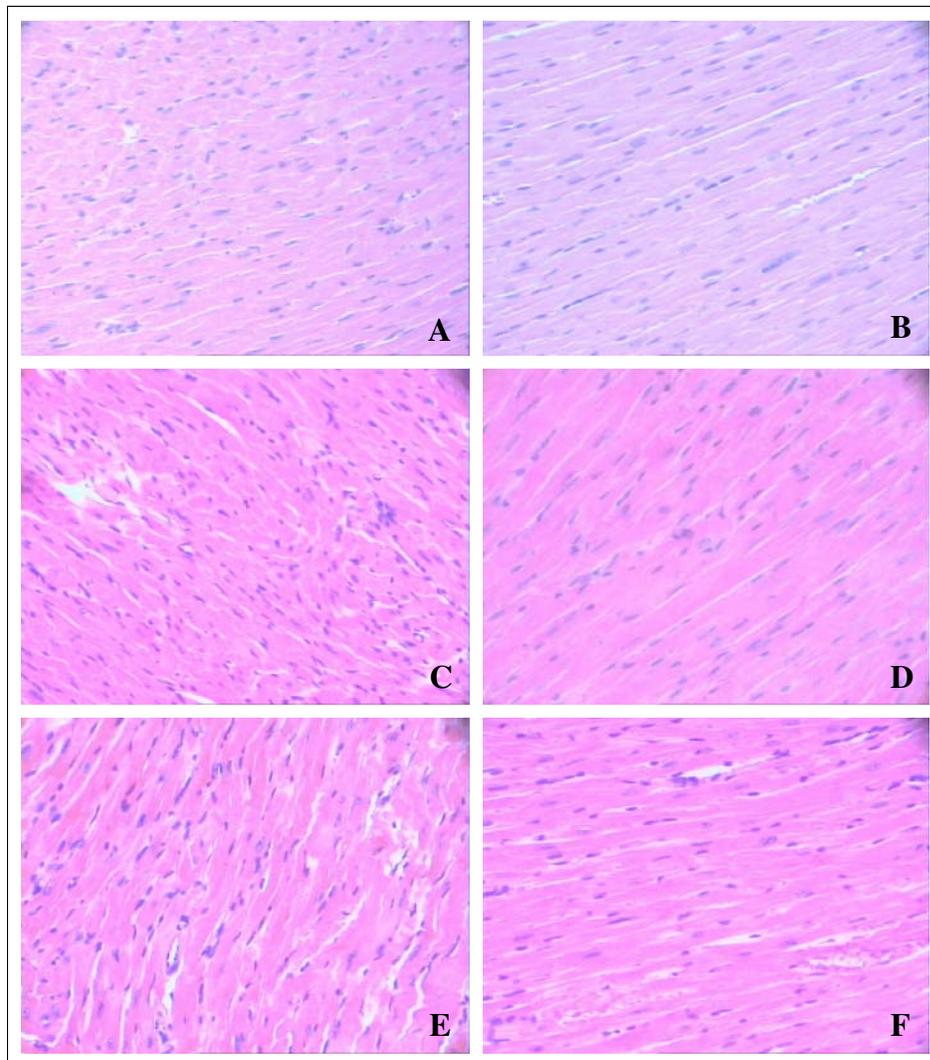


Figura 17. Fotomicrografias das fibras cardíacas de fêmeas prenhas, demonstrando a intensidade de infiltrados inflamatórios. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (A) nIP – não infetada prenha; (B) nIPZ – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; (C) IPY – infectada prenha cepa Y; (D) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (E) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (400X).

5.2.2)Baço

O baço dos animais controle (nInP, nInPZ, nIP e nIPZ) demonstrou estrutura tecidual regular com parênquima organizado tanto na região cortical como na medular.

De acordo com os aspectos histológicos do baço das fêmeas de todos os grupos experimentais (nIP, nIPZ, nInP, nInPZ, InPY, InPYZ, InPB, InPBZ, IPY, IPYZ, IPB e IPBZ), foi observada a presença de folículos da polpa branca com hiperplasia, sendo mais intensa nos animais infectados do que no grupo controle.

A suplementação de Zn aparentemente não alterou os aspectos histológicos desse tecido.

5.2.3)Fígado

O aspecto histológico do fígado das fêmeas dos grupos controles (nInP, nInPZ, nIP e nIPZ) demonstra parênquima organizado e núcleos arredondados. Os hepatócitos arranjados em lâminas ou cordões verticais à veia centrolobular com canalículos biliares entre hepatócitos adjacentes no cordão. Os sinusóides formados por uma camada contínua de células endoteliais fenestradas, estavam presentes entre os cordões de hepatócitos, enquanto que o espaço perisinusoidal localizados entre os hepatócitos e a parede dos sinusóides.

O fígado dos animais controle (nInP, nInPZ, nIP e nIPZ), apresentou discreto processo inflamatório mononuclear perivascular em relação aos animais infectados (Figura 18A e B; Figura 19A e B).

Para as fêmeas infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* (InPY, InPYZ, IPY e IPYZ), foi observado a presença de nódulos inflamatórios perivasculares e parênquimatoso multifocais distribuídos de forma aleatória e constituídos por células mononucleares.

Nesses locais foram visualizados parasitas interiorizados nos hepatócitos, com citoplasma repleto de formas amastigotas. Além disso, foram observados ninhos de amastigotas isoladamente no parênquima do órgão, sem a presença de infiltrados inflamatórios ao seu redor (Figura 18C e E; Figura 19C e E).

De maneira geral, o fígado de fêmeas infectadas com a cepa Y (InPY, InPYZ, IPY e IPYZ) apresentou número de infiltrado inflamatório mais intenso e difuso do que nas fêmeas infectadas com a cepa Bolívia, no entanto essa diferença foi significativa apenas entre os grupos InPY x InPB ($p < 0,01$ – ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni). Por outro lado, os nódulos inflamatórios no fígado das fêmeas infectadas com a cepa Bolívia apresentaram área maior do que na cepa Y, sendo estatisticamente significativo para InPY x InPB ($p < 0,01$) (Figura 18D e F; Figura 19D e F).

Comparando os resultados obtidos entre os grupos não infectados (nInP, nInPZ, nIP e nIPZ) com os grupos infectados com as cepas Y e Bolívia (InPY, InPYZ, InPB, InPBZ, IPY, IPYZ, IPB e IPBZ), foi verificado que a infecção promoveu um aumento significativo no número de infiltrados nos seguintes grupos : nInP x InPY = $p < 0,001$; nInPZ x InPBZ = $p < 0,01$; nIP x IPY = $p < 0,01$; nIP x IPB = $p < 0,05$; nIPZ x IPYZ = $p < 0,01$. Assim como, a infecção promoveu um aumento significativo ($p < 0,001$) no tamanho da área dos processos inflamatórios no tecido hepático em todos os grupos (Tabela 3).

Nas fêmeas não prenhas infectadas (InPY, InPYZ, InPB e InPBZ), os nódulos inflamatórios apresentaram-se de modo geral, maior número de infiltrados do que no fígado de fêmeas prenhas (IPY, IPYZ, IPB e IPBZ), sendo esse aumento estatisticamente significativo para InPY x IPY ($p < 0,001$). Essa mesma diferença entre fêmeas não prenhas infectadas e fêmeas prenhas infectadas, também foi observada em relação à área do infiltrado inflamatório, no entanto, essa diferença foi significativa apenas entre os grupos

infectados com a cepa Bolívia (InPB x IPB = $p < 0,001$; InPBZ x IPBZ = $p < 0,01$) (Tabela 3).

De acordo com os resultados obtidos para os grupos de fêmeas suplementadas (nInPZ, nIPZ, InPYZ, IPYZ, InPBZ e IPBZ), foi verificado que a suplementação de Zn reduziu o número de nódulos inflamatórios, sendo essa redução significativa para os grupos InPY x InPYZ ($p < 0,001$). Além disso, a suplementação também reduziu a área dos infiltrados inflamatórios em todos os grupos, no entanto essa diferença foi significativa entre os grupos InPB x InPBZ ($p < 0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise quantitativa e qualitativa de infiltrado inflamatório focal no Fígado de *Mus musculus* infectados com 4×10^4 formas tripomastigotas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* suplementadas com Zn.

Grupos	nº. de animais	Dias de infecção	Número médio de regiões apresentando infiltrado inflamatório focal \pm DP	Valor médio da área/ μm^2 dos infiltrados
Fêmeas não prenhas				
nInP	05	-	$4,4 \pm 2,3^{***}$	$28,7 \pm 5,6^{***}$
nInPZ	05	-	$6,4 \pm 3,0^{**}$	$11,44 \pm 2,7^{***}$
InPY	05	07	$165 \pm 67,8^{**/*}$	$168,9 \pm 35,4^{**/*}$
InPYZ	05	07	$57 \pm 24,6^{***}$	$146,16 \pm 35,2^{***}$
InPB	05	14	$43 \pm 11,3^{**}$	$408,14 \pm 122,2^{**/*}$
InPBZ	05	14	$74 \pm 47^{**}$	$246,58 \pm 82,3^{***}$
Fêmeas Prenhas				
nIP	05	-	$4 \pm 1,6^{*/**}$	$21,06 \pm 6,9^{***}$
nIPZ	05	-	$2 \pm 1,1^{**}$	$4,42 \pm 2,3^{***}$
IPY	05	07	$63 \pm 19,9^{**/*}$	$134,08 \pm 7,8^{***}$
IPYZ	05	07	$45 \pm 26,8^{**}$	$101,52 \pm 23,4^{***}$
IPB	05	14	$49 \pm 39^*$	$174,64 \pm 56,2^{***}$
IPBZ	05	14	$20 \pm 7,5$	$127,66 \pm 15,1^{**/*}$

DP – desvio padrão

* ($p < 0,05$) Diferença significativa no número médio de regiões apresentando infiltrado inflamatório focal entre os grupos (nIP x IPB).

** ($p < 0,01$) Diferença significativa no número médio de regiões apresentando infiltrado inflamatório focal entre os grupos (nIP x IPY; nIPZ x IPYZ; InPY x InPB; nInPZ x InPBZ) e no valor médio da área dos infiltrados inflamatórios entre os grupos (InPY x InPB; InPBZ x IPBZ).

*** ($p < 0,001$) Diferença significativa no número médio de regiões apresentando infiltrado inflamatório focal entre os grupos (nInP x InPY; InPY x InPYZ; InPY x IPY) e no valor médio da área dos infiltrados inflamatórios entre os grupos (nInP x InPB; nInP x InPY; nInPZ x InPYZ; nInPZ x InPBZ; InPB x InPBZ; InPB x IPB; nIPZ x IPBZ; nIP x IPY; nIPZ x IPYZ).

InPY – infectada não prenha cepa Y; InPB – infectada não prenha cepa Bolívia; InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; InPBZ – infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco; IPY – infectada prenha cepa Y; IPB – infectada prenha cepa Bolívia; IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; IPBZ – infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco.

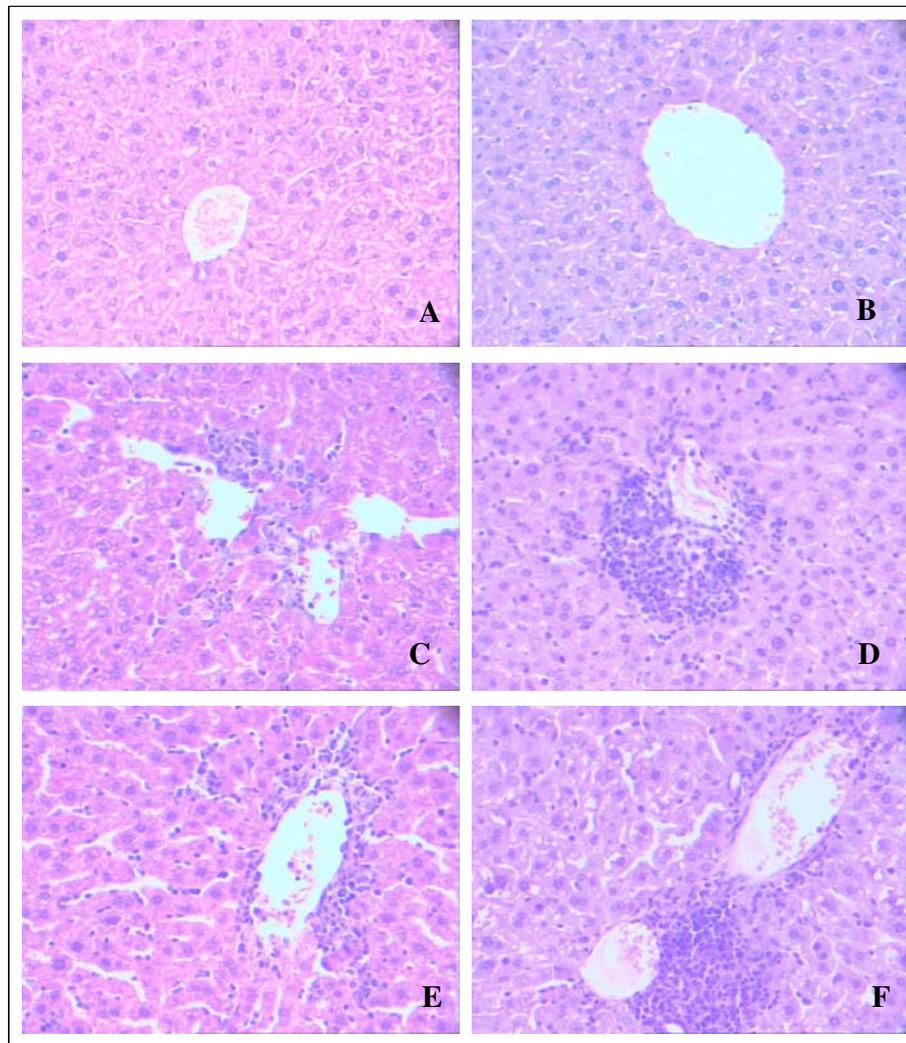


Figura 18. Fotomicrografias do fígado de fêmeas não prenhas, demonstrando a intensidade de infiltrados inflamatórios. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/kg de Sulfato de Zinco. (A) nInP – não infectada e não prenha; (B) nInPZ - não infectada e não prenha e suplementada; (C) InPY – infectada não prenha cepa Y; (D) InPB – infectada não prenha cepa Bolívia; (E) InPYZ – infectada não prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) InPBZ - infectada não prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (400X).

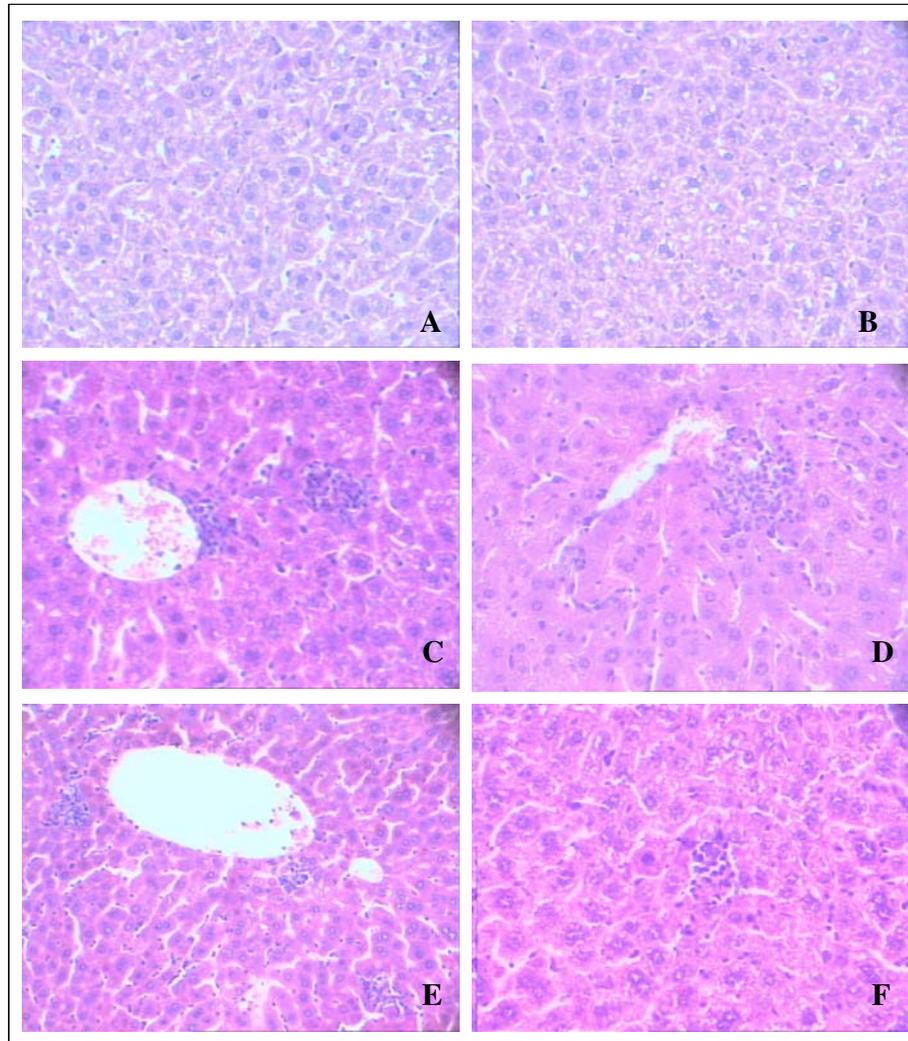


Figura 19. Fotomicrografias do fígado de fêmeas prenhas, demonstrando a intensidade de infiltrados inflamatórios. As fêmeas foram infectadas intraperitonealmente com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T.cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/kg de Sulfato de Zinco. (A) nIP – não infetada prenha; (B) nIPZ – não infectada prenha e suplementada com Sulfato de Zinco; (C) IPY – infectada prenha cepa Y; (D) IPB – infectada prenha cepa Bolívia; (E) IPYZ – infectada prenha cepa Y e suplementada com Sulfato de Zinco; (F) IPBZ - infectada prenha cepa Bolívia e suplementada com Sulfato de Zinco. Hematoxilina e eosina (400X).

5.2.4) Placenta

Na placenta dos animais controle (nIP e nIPZ), desde a camada materna ou decídua até os limites superficiais da camada labiríntica, as células exibiram regularidade de tamanho e aspecto regular, ausência de processo inflamatório, áreas de degeneração, necrose ou calcificação (Figuras 12, 13 e 14). As células gigantes, localizadas na periferia da placenta, em associação com a camada decídua e com os seios sanguíneos maternos, apresentaram núcleo regular, alongado, cromatina uniforme, nucléolo excêntrico e citoplasma de limites pouco precisos. A camada esponjosa apresentou espongioblastos regulares, com núcleo bem delimitado pela cromatina. Na região mais periférica da camada labiríntica, as células apresentaram-se em disposição lacunar, formando cordões celulares.

De modo geral, as placentas pertencentes às fêmeas infectadas (IPY, IPYZ, IPB e IPBZ), demonstraram alterações na organização tecidual, devido ao intenso parasitismo. Segundo a análise do parasitismo, todas as camadas foram parasitadas, sendo o parasitismo mais intenso no grupo infectado com a cepa Bolívia, apresentando células endoteliais e gigantes com ninhos de formas amastigotas.

Infiltrados inflamatórios estavam presentes nas camadas placentárias das fêmeas infectadas (IPY, IPYZ, IPB e IPBZ), porém de forma difusa discreta, caracterizando uma placentite moderada.

A suplementação de Zn não influenciou nas alterações visualizadas, pois o aspecto placentário de todos os grupos infectados foi similar.

6) Determinação das Concentrações de Zinco por Espectrofotometria de Absorção Atômica

6.1) Avaliação Quantitativa de Zinco Plasmático

6.1.1) Fêmeas não prenhas

De acordo com os resultados obtidos por meio do AAS (Figura 20), foi verificado por meio da análise estatística ANOVA fator duplo seguido do Teste de Bonferroni, que a infecção pelo *T. cruzi* não determinou uma redução significativa da concentração de Zn plasmático dos animais infectados com ambas as cepas (InPY – $0,142 \pm 0,016$ Zn μ g/mL e InPB – $0,143 \pm 0,03$ Zn μ g/mL), quando comparado com o grupo controle (nInP – $0,149 \pm 0,09$ Zn μ g/mL).

Assim como, nos animais que receberam a suplementação de Zn durante o processo de experimentação (nInPZ – $0,122 \pm 0,011$ Zn μ g/mL, InPYZ – $0,124 \pm 0,021$ Zn μ g/mL, InPBZ – $0,136 \pm 0,026$ Zn μ g/mL) não foi observada nenhuma alteração significativa em relação aos grupos não suplementados.

6.1.2) Fêmeas prenhas

Em relação às fêmeas prenhas (IPY – $0,085 \pm 0,012$ Zn μ g/mL e IPB – $0,103 \pm 0,015$ Zn μ g/mL) (Figura 20), foi verificado que a infecção pelo *T. cruzi* promoveu a redução da concentração de Zn plasmático quando comparado ao grupo controle (nIP – $0,121 \pm 0,03$ Zn μ g/mL), sendo que, essa redução foi estatisticamente significativa (ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni) no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Y (nIP x IPY = $p < 0,05$).

Comparando os grupos de fêmeas infectadas, foi observada que a cepa Y (IPY) determinou uma maior redução na concentração de Zn plasmático do que o grupo infectado com a cepa Bolívia (IPB), no entanto essa redução não foi estatisticamente significativa.

A suplementação de Zn não aumentou significativamente a concentração desse micronutriente nos grupos infectados (IPYZ – $0,119 \pm 0,02$ Zn μ g/mL e IPBZ – $0,118 \pm 0,017$ Zn μ g/mL), resultando em valores similares aos obtidos para o grupo controle suplementado (nIPZ – $0,124 \pm 0,02$ Zn μ g/mL).

Por outro lado, os grupos infectados e suplementados apresentaram maior concentração de Zn plasmático do que os grupos de fêmeas infectadas e não suplementadas (IPY e IPB), sendo que, a diferença existente entre as fêmeas dos grupos IPY x IYZ foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Entre os grupos de fêmeas não prenhas (nInP, nInPZ, InPY, InPYZ, InPB, InPBZ) e os grupos de fêmeas prenhas (nIP, nIPZ, IPY, IPYZ, IPB, IPBZ), infectados ou não, foi observado que a gestação diminuiu significativamente a concentração de Zn no plasma nos grupos infectados e não suplementados (InPY x IPY = $p < 0,01$; InPB x IPB = $p < 0,05$) (Figura 20).

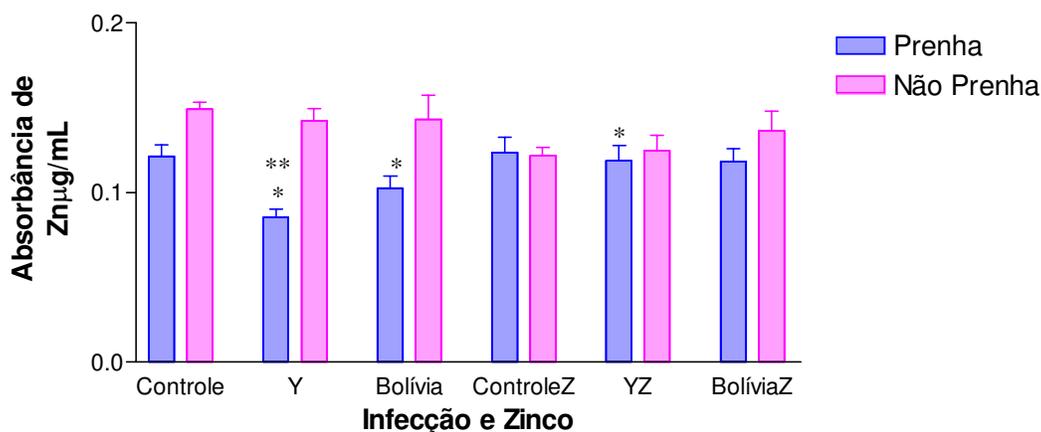


Figura 20. Comparação da concentração de Zn plasmático de camundongos fêmeas não prenhas ($n = 5$) e prenhas ($n = 5$), obtidas por meio de AAS utilizando soluções de calibração para Zn. As fêmeas foram infectadas com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/kg de Sulfato de Zinco. (* $p < 0,05$) Diferença significativa entre os grupos (nIP x IPY, IPY x IPYZ, InPB x IPB). (** $p < 0,01$) Diferença significativa entre os grupos (InPY x IPY). Controle – fêmeas não infectadas; Y – fêmeas infectadas com a cepa Y; Bolívia – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia; ControleZ – fêmeas não infectadas e suplementadas com Sulfato de Zinco; YZ – fêmeas infectadas com a cepa Y e suplementadas com Sulfato de Zinco; BolíviaZ – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas com Sulfato de Zinco.

6.2) Avaliação Quantitativa de Zinco Tecidual

6.2.1) Coração

De acordo com os resultados obtidos na Figura 21, foi observado que as fêmeas não prenhas infectadas (InPY – $0,028 \pm 0,005$ Znµg/mL, InPB – $0,032 \pm 0,003$ Znµg/mL e InPBZ – $0,033 \pm 0,008$ Znµg/mL), a concentração de Zn no coração foi estatisticamente menor do que nas fêmeas não prenhas e não infectadas (nInP – $0,039 \pm 0,0015$ Znµg/mL e

nInPZ – 0,040±0,005 Znµg/mL) de acordo com ANOVA fator duplo seguido do Teste de Bonferroni (nInP x InPY = p<0,01; nInP x InPB = p<0,05; nInPZ x InPBZ = p<0,05).

Nos grupos de fêmeas prenhas, foi verificado que apenas o grupo de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia (IPB – 0,035±0,003 Znµg/mL e IPBZ – 0,038±0,005 Znµg/mL) apresentaram diferença significativa na concentração de Zn cardíaco em relação aos grupos controle (nIP – 0,047±0,008 Znµg/mL e nIPZ – 0,047±0,005 Znµg/mL), onde nIP x IPB (p<0,01) e nIPZ x IPBZ (p<0,05). Entre os grupos de fêmeas prenhas e infectadas foi observado uma redução significativa (p<0,05) entre os grupos IPY (0,045±0,007 Znµg/mL) x IPB (0,035±0,003 Znµg/mL).

Quando foram comparados os resultados entre os grupos suplementados, foi verificado que para as fêmeas não prenhas infectadas com a cepa Y (InPYZ), a concentração de Zn no coração aumentou significativamente (p<0,01) em relação ao grupo infectado e não suplementado (InPY). Por outro lado, para as fêmeas infectadas com a cepa Bolívia não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado (InPBZ) e o grupo não tratado (InPB).

De acordo com a Figura 21, notou-se que a prenhez aumentou significativamente (p<0,05) a concentração de Zn no coração de fêmeas infectadas com a cepa Y (IPY), quando comparada com a concentração obtida para o grupo de fêmeas não prenhas infectadas (InPY). Nos demais grupos de fêmeas prenhas, não foram observadas diferenças significativas.

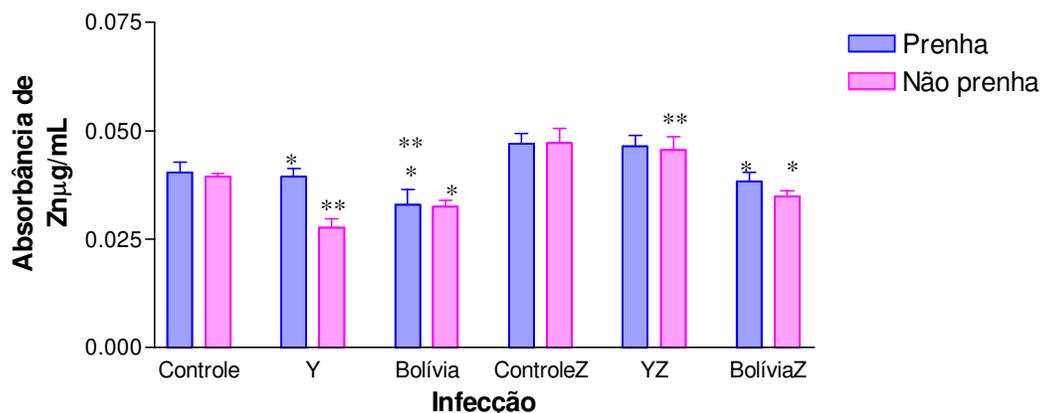


Figura 21. Comparação da concentração de Zn no coração de camundongos fêmeas não prenhas ($n = 5$) e prenhas ($n = 5$), obtida por meio de AAS utilizando soluções de calibração para Zn. As fêmeas foram infectadas com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (* $p < 0,05$) Diferença significativa entre os grupos (nInP x InPB; nInPZ x InPBZ; nIPZ x IPBZ; IPY x IPB; InPY x IPY). (** $p < 0,01$) Diferença significativa entre os grupos (nInP x InPY; nIP x IPB; InPY x InPYZ). Controle – fêmeas não infectadas; Y – fêmeas infectadas com a cepa Y; Bolívia – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia; ControleZ – fêmeas não infectadas e suplementadas com Sulfato de Zinco; YZ – fêmeas infectadas com a cepa Y e suplementadas com Sulfato de Zinco; BolíviaZ – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas com Sulfato de Zinco.

6.2.2) Baço

Para a análise do baço de fêmeas não prenhas infectadas com ambas as cepas de *T. cruzi* (InPY – $0,128 \pm 0,023$ Znµg/mL; InPYZ – $0,190 \pm 0,043$ Znµg/mL; InPB – $0,188 \pm 0,05$ Znµg/mL e InPBZ – $0,209 \pm 0,017$ Znµg/mL), a quantidade de Zn foi significativamente maior do que nos grupos não infectados (nInP – $0,069 \pm 0,02$ Znµg/mL e nInPZ – $0,062 \pm 0,03$ Znµg/mL), de acordo com ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni (nInP x InPB = $p < 0,001$; nInPZ x InPYZ = $p < 0,001$; nInPZ x InPBZ = $p < 0,001$; nInP x InPY = $p < 0,01$) (Figura 22).

No entanto, os valores obtidos para as fêmeas prenhas infectadas (IPY – $0,128 \pm 0,014$ Zn μ g/mL; IPB – $0,148 \pm 0,04$ Zn μ g/mL e IPBZ – $0,158 \pm 0,012$ Zn μ g/mL) foram semelhantes aos valores dos grupos não infectados (nIP – $0,140 \pm 0,04$ Zn μ g/mL e nIPZ – $0,149 \pm 0,03$ Zn μ g/mL) com exceção das fêmeas pertencentes ao grupo (IPYZ – $0,216 \pm 0,014$ Zn μ g/mL) que apresentaram maior concentração de Zn do que os grupos controle (nIP x IYZ = $p < 0,01$; nIPZ x IYZ = $p < 0,01$) (Figura 22).

Nas fêmeas prenhas controle (nIP e nIPZ) a gestação determinou um aumento significativo da concentração de Zn armazenada no baço em relação aos grupos não prenhas (nInP e nInPZ), onde nIP x nInP ($p < 0,01$) e nIPZ x nInPZ ($p < 0,001$). Por outro lado, nos animais infectados com cepa Bolívia (IPB e IPBZ) foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) da concentração de Zn, quando os resultados foram comparados com as fêmeas infectadas e não prenhas (InPB e InPBZ).

Nos resultados apresentados na Figura 22, foi observado também em relação à suplementação de Zn, que nos animais dos grupos controle (nInPZ e nIPZ), não apresentaram alterações significativas para a concentração de Zn no baço, demonstrando resultados similares aos dos grupos controle não suplementados (nInP e nIP). Entretanto, nos animais infectados com a cepa Y e suplementados (InPYZ e IYZ), os valores obtidos foram significativamente maiores do que os grupos que não receberam a suplementação (InPY e IYZ), onde InPY x InPYZ ($p < 0,05$) e IYZ x IYZ ($p < 0,001$).

Comparando os resultados obtidos entre os grupos infectados e suplementados, foi observado uma diferença significativa na concentração entre os grupos IYZ x IPBZ ($p < 0,01$). Entre os demais grupos não foram verificadas alterações significativas na concentração de Zn no baço.

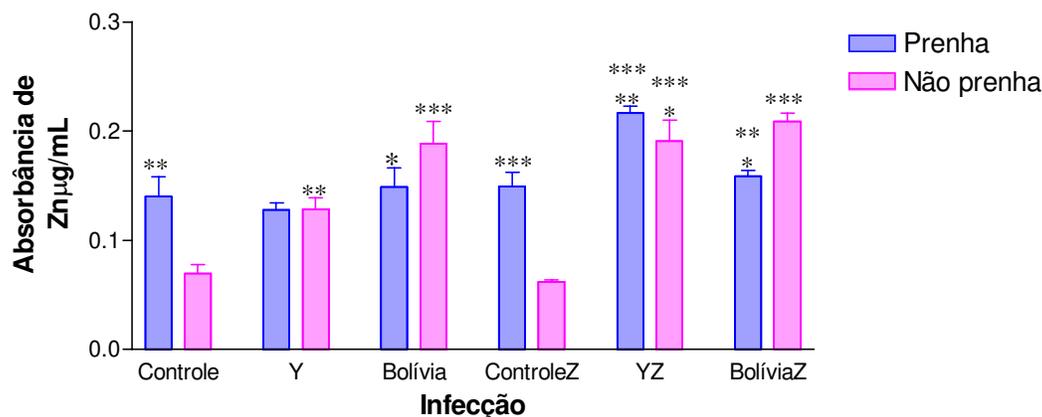


Figura 22. Comparação da concentração de Zn no baço de camundongos fêmeas não prenhas ($n = 5$) e prenhas ($n = 5$), obtida por meio de AAS utilizando soluções de calibração para Zn. As fêmeas foram infectadas com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (* $p < 0,05$) Diferença significativa entre os grupos (InPB x IPB; InPBZ x IPBZ; InPY x InPYZ). (** $p < 0,01$) Diferença significativa entre os grupos (nInP x InPY; nIP x IPYZ; nIPZ x IPYZ; nIP x nInP; IPYZ x IPBZ). (***) $p < 0,001$) Diferença significativa entre os grupos (nInP x InPB; nInPZ x InPYZ; nInPZ x InPBZ; nIPZ x nInPZ; IPY x IPYZ). Controle – fêmeas não infectadas; Y – fêmeas infectadas com a cepa Y; Bolívia – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia; ControleZ – fêmeas não infectadas e suplementadas com Sulfato de Zinco; YZ – fêmeas infectadas com a cepa Y e suplementadas com Sulfato de Zinco; BolíviaZ – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas com Sulfato de Zinco.

6.2.3) Fígado

Analisando os dados da Figura 23 foi verificada que as fêmeas não prenhas infectadas com as cepas de *T. cruzi* (InPYZ – $0,476 \pm 0,07$ Znµg/mL; InPB – $0,487 \pm 0,07$ Znµg/mL e InPBZ – $0,483 \pm 0,09$ Znµg/mL), apresentaram maior concentração de Zn ($p < 0,01$) armazenada nos hepatócitos do que as fêmeas não prenhas e não infectadas (nInP – $0,374 \pm 0,02$ Znµg/mL e nInPZ – $0,398 \pm 0,05$ Znµg/mL). As fêmeas não prenhas

infectadas com a cepa Y e não suplementadas (InPY – $0,390 \pm 0,035$ Zn μ g/mL), não demonstraram alterações significativas em relação aos grupos controles.

De acordo com a análise estatística de ANOVA fator duplo seguido do Teste de Bonferroni, as fêmeas prenhas infectadas (IPY – $0,625 \pm 0,085$ Zn μ g/mL e IPB – $0,569 \pm 0,04$ Zn μ g/mL), a concentração de Zn foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que nas fêmeas não infectadas (nIP – $0,706 \pm 0,12$ Zn μ g/mL) (Figura 23). Por outro lado, as fêmeas prenhas e infectadas com a cepa Bolívia (IPBZ – $0,966 \pm 0,04$ Zn μ g/mL) apresentaram concentração maior ($p < 0,05$) do que o grupo controle suplementado (nIPZ – $0,789 \pm 0,03$ Zn μ g/mL).

Comparando os resultados obtidos entre as fêmeas prenhas e não prenhas, foi observado um aumento significativo na concentração de Zn nos grupos (nIP; nIPZ; IPY, IPYZ – $0,906 \pm 0,06$ Zn μ g/mL e IPBZ) em relação às fêmeas não prenhas (nInP, nInPZ, InPY, InPYZ, e InPBZ), onde nInP x nIP ($p < 0,001$), nInPZ x nIPZ ($p < 0,001$), InPY x IPY ($p < 0,001$), InPYZ x IPYZ ($p < 0,001$), InPBZ x IPBZ ($p < 0,001$).

Entre as fêmeas prenhas infectadas e suplementadas (IPYZ e IPBZ) a concentração de Zn foi maior ($p < 0,001$) quando comparada com a concentração obtida para as fêmeas prenhas infectadas e não suplementadas (IPY e IPB).

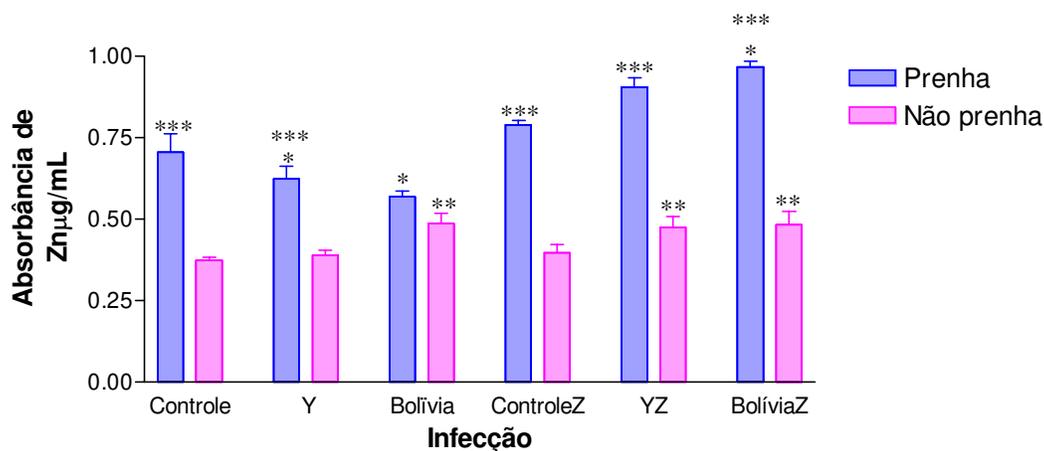


Figura 23. Comparação da concentração de Zn no fígado de camundongos fêmeas não prenhas (n =5) e prenhas (n =5), obtida por meio de AAS utilizando soluções de calibração para Zn. As fêmeas foram infectadas com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (* p<0,05) Diferença significativa entre os grupos (nIP x IPY; nIP x IPB; nIPZ x IPBZ). (** p<0,01) Diferença significativa entre os grupos (nInP x InPB; nInPZ x InPYZ; nInPZ x InPBZ). (***) p<0,001) Diferença significativa entre os grupos (nInP x nIP; nInPZ x nIPZ; InPY x IPY; InPYZ x IPYZ; InPBZ x IPBZ; IPY x IPYZ; IPB x IPBZ). Controle – fêmeas não infectadas; Y – fêmeas infectadas com a cepa Y; Bolívia – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia; ControleZ – fêmeas não infectadas e suplementadas com Sulfato de Zinco; YZ – fêmeas infectadas com a cepa Y e suplementadas com Sulfato de Zinco; BolíviaZ – fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas com Sulfato de Zinco.

6.2.4) Placenta

De acordo com os resultados apresentados na Figura 24, foi observado que as fêmeas infectadas (IPY – $0,119 \pm 0,03$ Znµg/mL; IPYZ – $0,184 \pm 0,02$ Znµg/mL; IPB – $0,122 \pm 0,02$ Znµg/mL e IPBZ – $0,149 \pm 0,05$ Znµg/mL) apresentaram concentração de Zn significativamente menor (ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni) do que as fêmeas não infectadas (nIP – $0,233 \pm 0,02$ Znµg/mL e nIPZ – $0,293 \pm 0,01$ Znµg/mL), onde nIP x IPY (p<0,001), nIP x IPB (p<0,01), nIPZ x IPYZ (p<0,001), nIPZ x IPBZ (p<0,001).

Para os grupos (nIPZ e IPYZ), a suplementação de Zn aumentou significativamente a concentração desse elemento traço na placenta de camundongos, quando comparada com a concentração de Zn obtida de fêmeas não suplementadas (nIP e IPY), demonstrando ($p < 0,01$) para IPY x IPYZ e ($p < 0,05$) para nIP x nIPZ. Em relação às cepas de *T. cruzi*, foi verificado que a suplementação não promoveu diferenças significativas na concentração de Zn entre as fêmeas infectadas com a cepa Y e Bolívia.

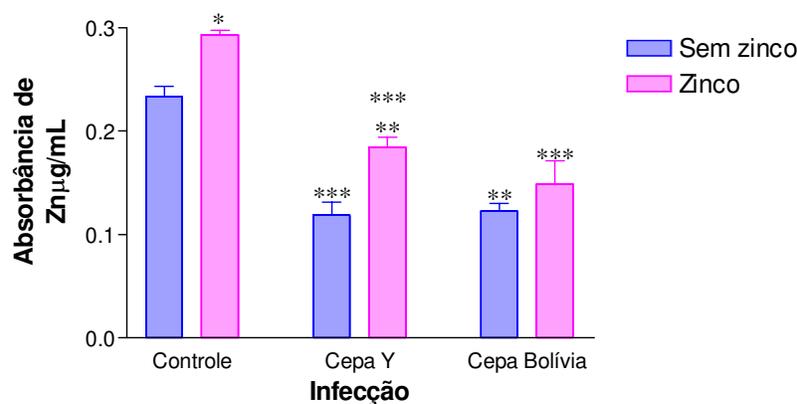


Figura 24. Comparação da concentração de Zn nas placentas ($n = 5$ / fêmea $n = 5$) de camundongos fêmeas prenhas ($n = 5$), obtida por meio de AAS utilizando soluções de calibração para Zn. As fêmeas foram infectadas com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/Kg de Sulfato de Zinco. (* $p < 0,05$) Diferença significativa entre os grupos (nIP x nIPZ). (** $p < 0,01$) Diferença significativa entre os grupos (nIP x IPB; IPY x IPYZ). (***) $p < 0,001$) Diferença significativa entre os grupos (nIP x IPY; nIPZ x IPYZ; nIPZ x IPBZ).

6.2.5)Fetos

Na quantificação de Zn nos tecidos fetais dos grupos experimentais, foi possível observar que os fetos de fêmeas infectadas com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* (IPY – $0,219 \pm 0,01$ Znµg/mL e IPB – $0,211 \pm 0,04$ Znµg/mL), apresentaram concentração de Zn semelhante a do grupo controle (nIP – $0,217 \pm 0,04$ Znµg/mL) (Figura 25). Entretanto, nas

fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas (IPBZ – $0,259 \pm 0,04$ Zn μ g/mL) foi observado uma redução significativa ($p < 0,001$) da concentração de Zn em relação ao grupo controle suplementado (nIPZ – $0,362 \pm 0,03$ Zn μ g/mL).

Após a suplementação materna de Zn, os fetos dos grupos (nIPZ e IPYZ – $0,297 \pm 0,05$ Zn μ g/mL) demonstraram aumento significativo (ANOVA fator duplo e Teste de Bonferroni) da concentração de Zn tecidual em relação aos grupos não suplementados (nIP e IPY), onde nIP x nIPZ ($p < 0,001$) e IPY x IPYZ ($p < 0,05$).

Comparando os resultados obtidos para os fetos de fêmeas infectadas, não foi observada diferença significativa entre as cepas de *T. cruzi*.

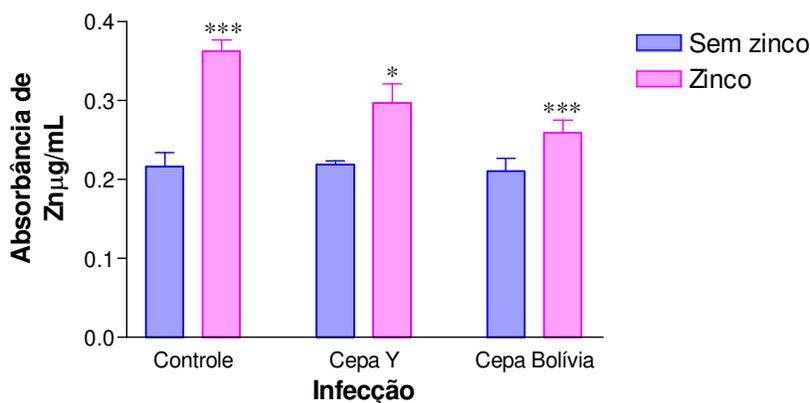


Figura 25. Comparação da concentração de Zn nos fetos ($n = 5$ / fêmea $n = 5$) de camundongos fêmeas prenhas ($n = 5$), obtida por meio de AAS utilizando soluções de calibração para Zn. As fêmeas foram infectadas com 4×10^4 formas tripomastigotas/mL das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Submetidas à suplementação diária com 20mg/kg de Sulfato de Zinco. (* $p < 0,05$) Diferença significativa entre os grupos (IPY x IPYZ). (***) $p < 0,001$) Diferença significativa entre os grupos (nIP x nIPZ; nIPZ x IPBZ).

7) Avaliação “in vitro” do Sulfato de Zinco em cultura de células

Utilizando cultura de células LLMCK₂, foi avaliada a ação do ZnSO₄ sobre as células, com intuito de verificar a ocorrência de efeitos citotóxicos (Figuras 26 e 27).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 4, foi verificado que as concentrações de ZnSO₄ utilizadas nesse ensaio foram tóxicas para células, apresentando baixo IC₅₀ (25.09 μg/mL). Por outro lado, o Benzonidazol, foi menos tóxico às células (IC₅₀ 184.3 μg/mL), visto que as concentrações utilizadas foram às mesmas do ZnSO₄.

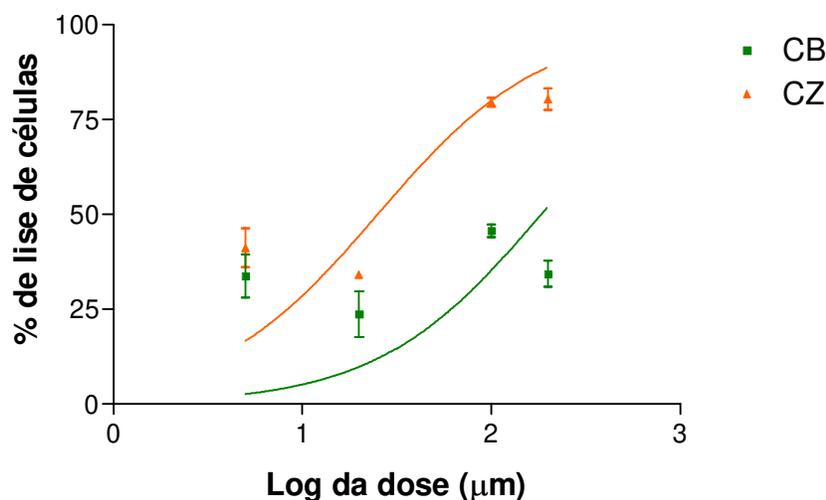


Figura 32. Curva dose-resposta de ZnSO₄ e Benzonidazol sobre células LLCMK₂, obtidas após 24 hs de incubação em estufa de CO₂. As concentrações utilizadas foram de 10, 20, 100 e 200 μg/mL. CB – células com Benzonidazol; CZ – células com ZnSO₄.

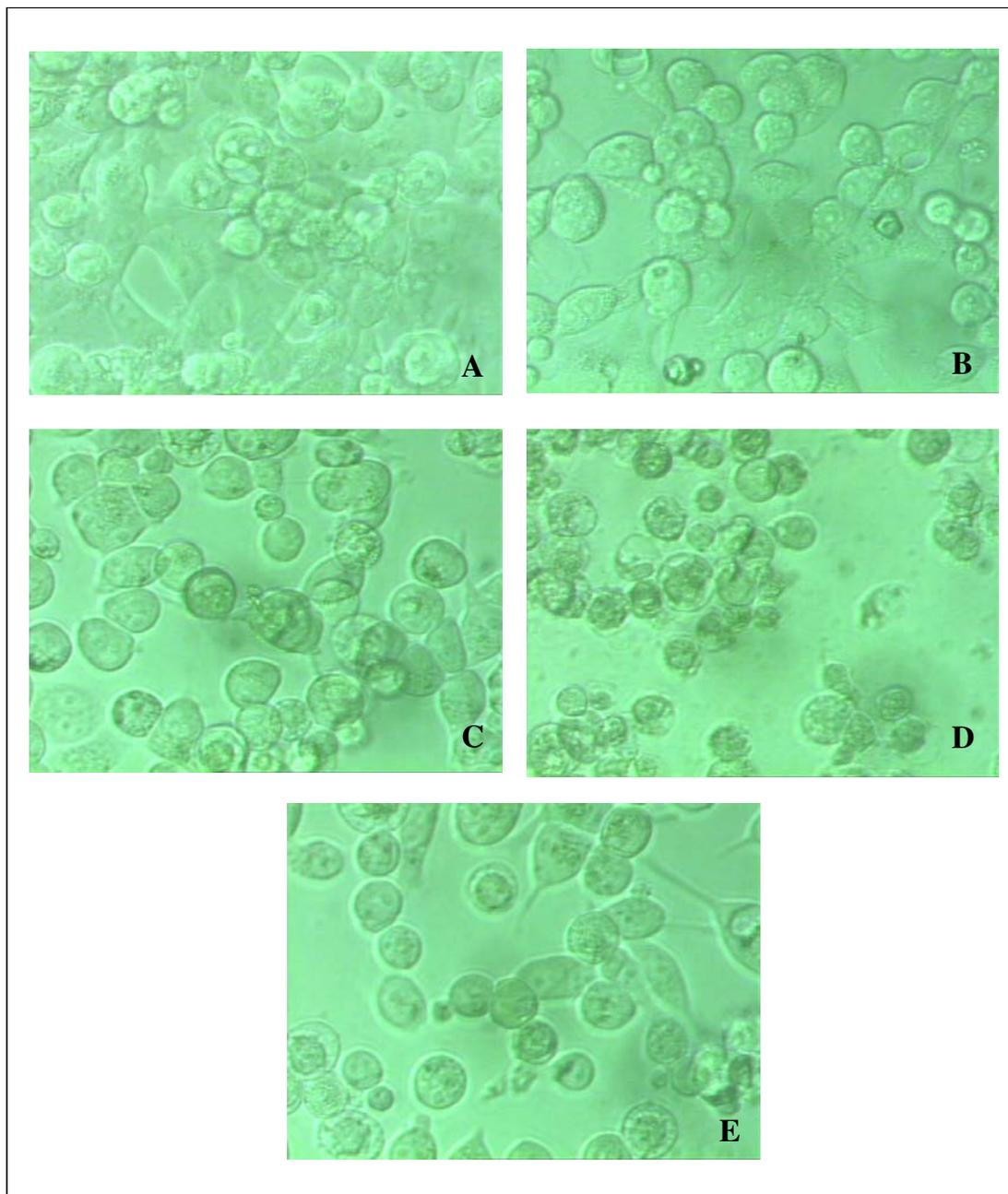


Figura 27. Imagens capturadas da Avaliação "in vitro" do Sulfato de Zinco em cultura de células após 24horas (200x). (A) células (controle); (B) células tratadas com 200µg/mL de Benzimidazol; (C) células tratadas com 10µg/mL de Benzimidazol; (D) células tratadas com 200µg/mL de sulfato de zinco; (E) células tratadas com 10µg/mL de Sulfato de Zinco.

Tabela 4. Avaliação “*in vitro*” do Sulfato de Zinco e Benzonidazol em cultura com células LLCMK₂ sem infecção, células infectadas e sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*. CSI – células sem infecção; CY – células infectadas com a cepa Y; CB – células infectadas com a cepa Bolívia; AY – formas amastigotas cepa Y; AB – formas amastigotas cepa Bolívia.

Substâncias/ Células	% de lise ± DP* x concentração (µg/mL)**				IC ₅₀ ***
	10	20	100	200	
Benzonidazol					
CSI	33.7 ± 9.7	23.7 ± 10.4	45.6 ± 2.7	34.3 ± 6.0	184.3
CY	4.7 ± 3.3	12.8 ± 4.4	10.0 ± 10.5	12.5 ± 2.6	1116
CB	45.5 ± 23.3	51.1 ± 12.2	59.9 ± 10.9	58.9 ± 18.8	27.9
AY	4.1 ± 5.8	21.8 ± 2.6	27.9 ± 3.9	27.5 ± 5.5	357.6
AB	32.9 ± 6.8	19.1 ± 5.9	11.8 ± 19.7	9.7 ± 5.3	1109
Zinco					
CSI	41.2 ± 8.8	34.1 ± 1.2	79.6 ± 1.9	80.4 ± 4.9	25.09
CY	17.1 ± 8.7	13.6 ± 9.4	56.4 ± 4.3	60.2 ± 3.5	97.47
CB	24.3 ± 11.2	49.4 ± 10.9	78.1 ± 6.0	64.8 ± 8.5	26.13
AY	2.0 ± 3.5	9.7 ± 2.7	41.8 ± 8.9	54.9 ± 4.3	153.9
AB	17.1 ± 6.6	23.2 ± 4.2	51.7 ± 7.9	59.2 ± 4.0	97.73

* DP – desvio padrão

**Controle Positivo – meio RPMI 1640

*** IC₅₀ – Coeficiente inibitório

CSI – células sem infecção (controle); CY – células infectadas com a cepa Y; CB – células infectadas com a cepa Bolívia; AY – formas amastigotas da cepa Y; AB – formas amastigotas da cepa Bolívia.

8) Avaliação “in vitro” do Sulfato de Zinco em cultura de células infectadas com T. cruzi

De acordo com os dados obtidos na Tabela 4 e nas Figuras 28 e 29, foi observado que o ZnSO₄ apresentou maior toxicidade sobre as células infectadas com formas amastigotas da cepa Bolívia (IC₅₀ 26.13µg/mL) do que sobre as células infectadas com a cepa Y (IC₅₀ 97.47 µg/mL). O mesmo resultado foi observado em relação ao Benzonidazol, onde para a cepa Bolívia foi observado menor valor de IC₅₀ (27.9 µg/mL).

Comparando os resultados obtidos entre as substâncias testadas, foi verificado que o Zn foi mais citotóxico para as células do que o Benzonidazol. Dessa forma, a citotoxicidade não está relacionada com a infecção, pois este mesmo resultado foi obtido quando foi avaliado o efeito de Zn sobre células não infectadas.

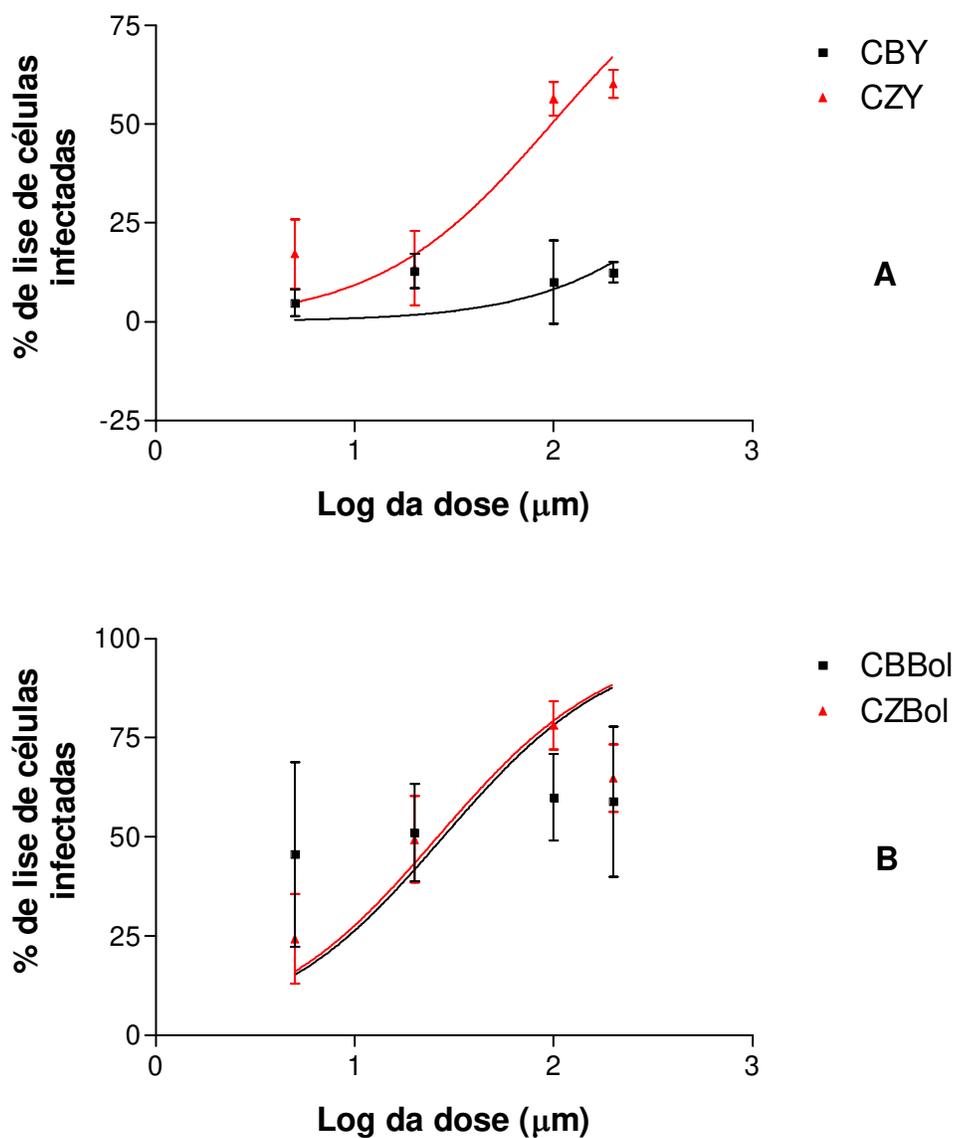


Figura 28. Curva dose-resposta de ZnSO_4 e Benzonidazol sobre células LLCMK₂ infectadas com formas amastigotas das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *T. cruzi*, obtidas após 24 hs de incubação em estufa de CO_2 . As concentrações utilizadas foram de 10, 20, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. CB – células com Benzonidazol; CZ – células com ZnSO_4 .

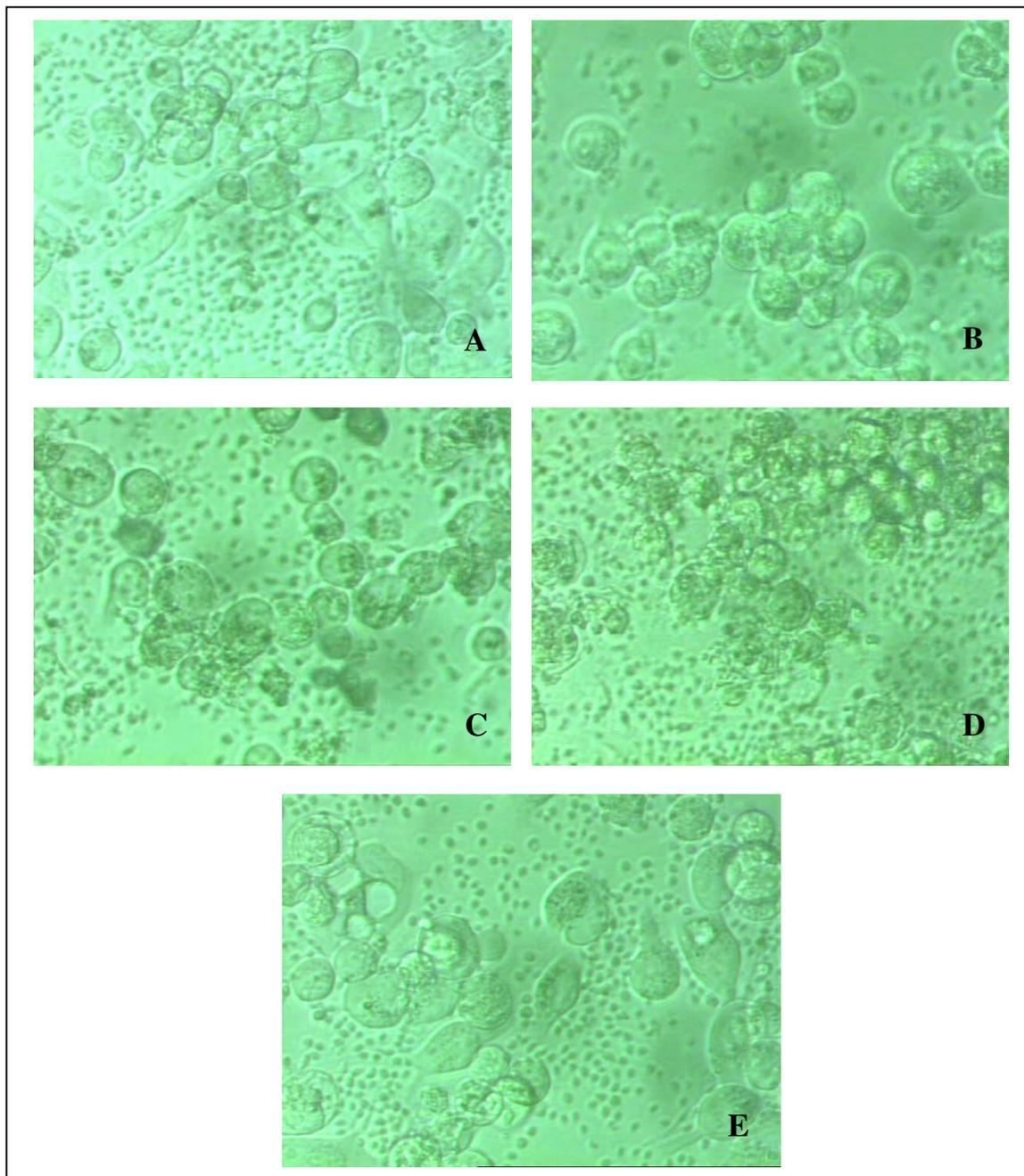


Figura 29. Imagens capturadas da Avaliação "in vitro" do Sulfato de Zinco em cultura de células infectadas com *T. cruzi* após 24 horas (200x). (A) células e formas amastigotas (controle); (B) células e formas amastigotas tratadas com 200 µg/mL de Benzonidazol; (C) células e formas amastigotas tratadas com 10 µg/mL de Benzonidazol; (D) células e formas amastigotas tratadas com 200 µg/mL de sulfato de zinco; (E) células e formas amastigotas tratadas com 10 µg/mL de Sulfato de Zinco.

9) Avaliação tripanocida “in vitro” do Sulfato de Zinco sobre as formas amastigotas de T. cruzi

Foi avaliada a ação do ZnSO₄ sobre as formas amastigotas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* em meio de cultivo acelular, com objetivo de verificar se esse micronutriente possui potencial tripanocida (Figuras 30 e 31).

De acordo com os resultados da Tabela 4, o ZnSO₄ nas concentrações de 100 e 200µg/mL apresentou lise parasitária acima de 50% das formas amastigotas da cepa Bolívia (51.7% ± 7.9; 59.2% ± 4.0). Entretanto para a cepa Y, apenas na concentração de 200µg/mL promoveu a lise de 54.9% do parasito.

Em relação ao Benzonidazol, foi verificado que na concentração de 200µg/mL essa substância causou a lise de 27.5% das formas amatigotas da cepa Y e 9.7% para a cepa Bolívia.

Sendo assim, foi verificado que o ZnSO₄ exerceu maior potencial tripanocida sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*, quando comparado com os resultados obtidos para o Benzonidazol.

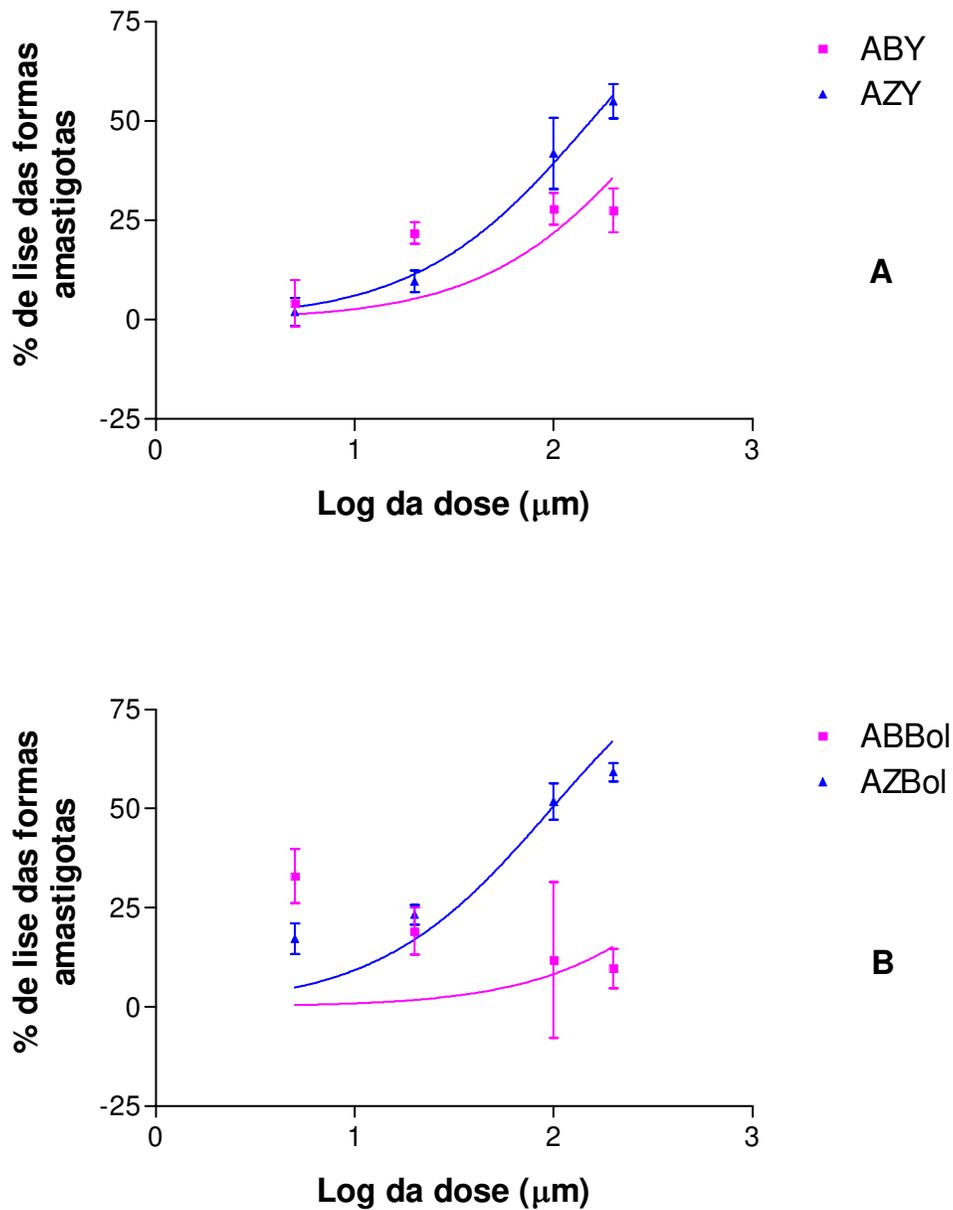


Figura 30. Curva dose-resposta de ZnSO_4 e Benzonidazol sobre as formas amastigotas das cepas Y (A) e Bolívia (B) de *T. cruzi*, obtidas após 24 hs de incubação em estufa de CO_2 . As concentrações utilizadas foram de 10, 20, 100 e $200\mu\text{g/mL}$. CB – células com Benzonidazol; CZ – células com ZnSO_4 .

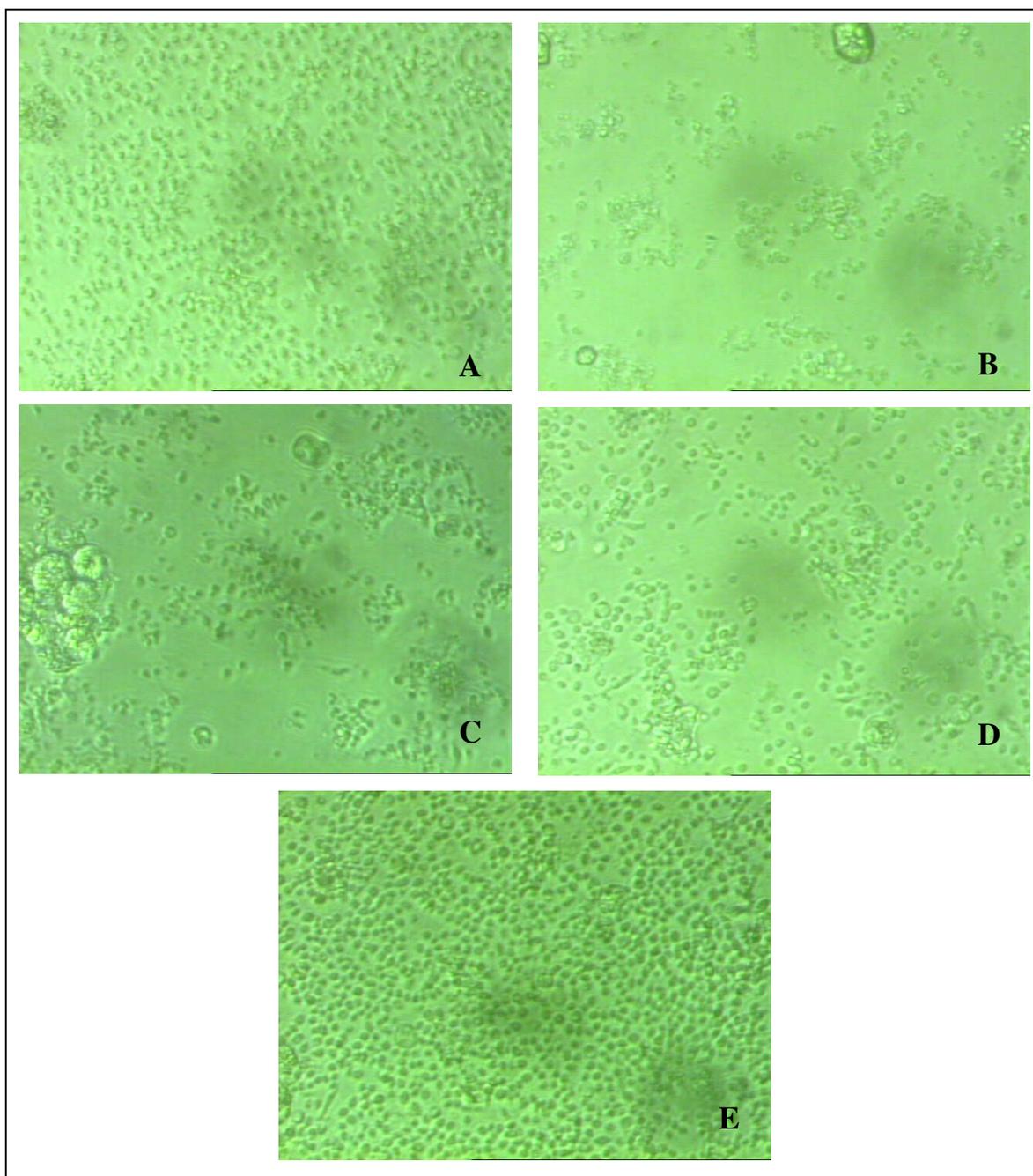


Figura 31. Imagens capturadas da Avaliação tripanocida "in vitro" do Sulfato de Zinco sobre as formas amastigotas de *T. cruzi* após 24 horas (200x). (A) formas amastigotas (controle); (B) formas amastigotas tratadas com 200µg/mL de Benznidazol; (C) formas amastigotas tratadas com 10µg/mL de Benznidazol; (D) formas amastigotas tratadas com 200µg/mL de sulfato de zinco; (E) formas amastigotas tratadas com 10µg/mL de Sulfato de Zinco.

VII. DISCUSSÃO

1) Parasitemia

O comportamento da curva parasitêmica apresentado pelos grupos experimentais está de acordo com os dados previamente relatados, onde as amostras de *T. cruzi* com predomínio de formas delgadas apresentam período pré-patente e curva parasitêmica de ascensão e queda rápida. Já as amostras constituídas por formas largas, mostraram um período pré-patente mais demorado e curva parasitêmica de ascensão, e descensos lentos e progressivos (ANDRADE et al., 1970; BRENER, CHIARI, 1983).

De acordo com os dados obtidos, o grupo contendo fêmeas prenhas e infectadas para ambas as cepas, assim como o grupo contendo fêmeas prenhas infectadas e suplementadas, apresentaram menor parasitemia do que aqueles contendo fêmeas não prenhas, principalmente no grupo de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia. Esses resultados foram similares aos observados em camundongos durante a fase crônica da infecção, onde a gestação não influenciou na infecção, pois não ocorreu reativação da doença e a parasitemia foi similar entre animais prenhas e não prenhas (CARLIER et al., 1987).

Por outro lado, estudos verificaram que a parasitemia aumentou durante a gestação, especialmente no 3º trimestre, diminuindo após o nascimento (BITTENCOURT, 1992; MENEZES et al., 1992).

De acordo com a avaliação da parasitemia dos grupos experimentais foi verificado que a suplementação desse micronutriente, promoveu a redução do número de parasitas nos grupos de fêmeas não prenhas infectadas com cepa Bolívia.

Nesse mesmo sentido, Wirth et al. (1989) e Cook-Mills et al. (1990), relataram que a reposição de Zn alterou o comportamento da infecção, melhorando a resposta imune dos animais tratados em relação àqueles utilizados como controle.

De Souza et al. (2003), observaram que camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e que receberam a suplementação de 0.25 e 1ppm de Selênio (Se), apresentaram curva parasitêmica similar ao grupo não suplementado. Entretanto os animais que receberam 4, 8 e 16ppm de Se demonstraram uma diminuição da parasitemia dose-dependente.

Esses resultados indicaram a necessidade do Zn e outros microelementos na dieta alimentar, associando-o como um importante cofator em eventos bioquímicos associados à atividade dos macrófagos, visto que, macrófagos peritoniais de camundongos que receberam dieta deficiente de Zn apresentaram capacidade reduzida em fagocitar e destruir o parasito (WIRTH et al., 1989).

Sendo assim, a suplementação de Zn poderá reduzir os danos causados aos hospedeiros durante a infecção, assim como favorecer melhor desenvolvimento dos fetos de camundongos infectados, pois a infertilidade, a malformação fetal e abortos associados ou não com a infecção congênita, foram relatados em camundongos cronicamente infectados (CARLIER et al., 1987; GONZALEZ et al., 1999; MJIHDI et al., 2002). Geralmente, essas conseqüências foram observadas em camundongos que apresentavam parasitas na camada decídua e necrose da placenta e dos fetos (MJIHDI et al., 2002).

Portanto, as avaliações histológicas dos tecidos maternos, placentas e fetos têm grande importância na averiguação da intensidade do parasitismo, principalmente nos grupos que apresentaram baixa parasitemia, assim como para observar os efeitos da suplementação de Zn sobre a infecção tecidual.

2)Peso e medidas

Os efeitos da suplementação ou da deficiência de microelementos são muito variáveis entre os trabalhos já relatados. As diferenças encontradas, geralmente estão relacionadas ao modelo experimental, concentração de microelemento, tempo de suplementação ou deficiência, presença de agente patogênico e via de administração.

No presente trabalho, a comparação entre os grupos de fêmeas não prenhas e prenhas foi observado que a infecção por *T. cruzi*, não alterou significativamente o peso dos animais, assim com não houve diferenças de peso entre as fêmeas infectadas com cepas Y e Bolívia.

Da mesma forma, Henriques; Cozzolino (2001) verificaram que ratos jovens alimentados com dietas enriquecidas com Zn não apresentaram alterações no peso. Assim como, ratos prenhas que receberam a alimentação suplementada com 6mgZn/Kg não apresentaram diferenças significativas no peso no 22º. dia em relação ao grupo controle (YASDANI et al., 1992).

Por outro lado, as diferenças na concentração de Zn na dieta foram observadas em ratos *Wistar* prenhas, onde inicialmente o peso entre os grupos não alterou. Porém, no final da gestação (20º. dia), os animais que receberam dieta deficiente de Zn pesaram menos do que os animais controles (TRAVÉ et al., 1985).

De Souza et al. (2003), verificaram que camundongos não infectados pelo *T. cruzi* e suplementados com Se, apresentaram uma leve tendência à perda de peso nos grupos que receberam 16ppm de Se. Em camundongos, a diminuição do peso corpóreo

após várias semanas de tratamento com concentrações acima de 10ppm de Se tem sido reportada (TURAN et al., 1999).

Os efeitos da infecção chagásica materna sobre o peso dos fetos, foram observados em trabalhos com diversas cepas de *T. cruzi*, relatando que a diversidade das cepas também interfere nesse parâmetro. No entanto, no presente trabalho a infecção por *T. cruzi* e a suplementação de Zn não promoveram alterações no peso e no tamanho dos fetos dos grupos experimentais.

Nesse mesmo sentido, Daston (1982) observou que o tratamento com 12mg/Kg de Zn nos 12°. - 15°. dias de gestação, não afetou significativamente o peso dos fetos de ratos. Assim como, fetos de ratos prenhas que receberam alimentação suplementada com 6mgZn/Kg durante a gestação, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (DILTS, AHOKAS, 1980; YASDANI et al., 1992).

Por outro lado, fetos de camundongos inoculados com diversas cepas de *T. cruzi* tiveram seus pesos significativamente diminuídos com relação ao peso dos fetos do grupo controle. Entretanto, comparando os grupos infectados, foi observado que na cepa RC os fetos foram significativamente mais pesados do que os fetos dos grupos das cepas Y e Bolívia (MENEGUETTE, 1997).

Do mesmo modo, a avaliação do peso dos fetos de camundongos infectados pelas cepas MORC-1 e RAL de *T. cruzi*, foi significativamente menor do que para o grupo não infectado, indicando que a infecção materna alterou o desenvolvimento fetal (CARRARO ABRAHÃO, 2000; BADRA, 2004).

O retardo no crescimento fetal (40%) foi observado no grupo infectado com a cepa Tehuantepec, sustentando a hipótese da existência de lesões placentárias que podem

alterar o transporte de glicose pela placenta levando à perda de peso dos fetos (MJIHDI et al., 2002).

Em relação à placenta, a infecção materna com as cepas Y e Bolívia, e a suplementação de Zn também não causaram alterações significativas no peso placentário em relação ao grupo controle.

Nos animais infectados com as cepas Colombiana, RC, Y e Bolívia de *T. cruzi*, não foram observadas diferenças significativas no peso, volume e diâmetro das placentas (MENEGUETTE, 1997). Assim como, o estudo da placenta de camundongos infectados pela cepa MORC-1 de *T. cruzi* mostrou que o peso e o diâmetro placentário não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e o grupo infectado (BADRA, 2004).

No entanto, placentas de animais infectados pela cepa RAL apresentaram peso e diâmetro diminuídos (CARRARO ABRAHÃO, 2000; CARRARO ABRAHÃO et al., 2003). Do mesmo modo Mijihdi et al. (2002), verificaram que o peso placentário de camundongos infectados com a cepa Tehuantepec apresentou redução de 22% quando comparado com o grupo controle.

Segundo Bonds et al. (1984), existe uma associação entre o peso fetal e o peso placentário, onde cerca de 98% do crescimento fetal ocorre durante as últimas nove semanas de gestação, quando os fetos são totalmente dependentes da placenta para sua suplementação de nutrientes e oxigênio.

Alterações no fluxo sanguíneo placentário podem modificar o tamanho e o peso fetal. Assim, essas alterações podem resultar em hipóxia fetal, provocando retardo do

crescimento intra-uterino, gerando fetos de menor comprimento e peso (BITTENCOURT, 1976). No presente estudo, a avaliação do peso placentário e do comprimento corpóreo de fetos originados de fêmeas infectadas por *T. cruzi* e suplementadas com Zn, não demonstrou alterações significativas quando comparado com os resultados apresentados pelos grupos controle.

A ausência de alterações no comprimento dos fetos após a suplementação com Zn, também foi observada por Daston (1982), onde ratos prenhas tratados com 12mg/Kg de Zn durante os 12°. - 15°. dias de gestação, não alterou as medidas do comprimento fetal em relação aos valores demonstrados pelo grupo tratado com salina (controle).

No entanto, em ratos experimentais que sofreram redução em 30% de alimento durante a gestação, apresentaram filhotes menores do que os filhotes de fêmeas que receberam alimentação *ad libitum* (WOODALL et al., 1996).

Diante dos efeitos deletérios determinados pela deficiência de Zn durante a gestação, assim como, com o aumento da frequência de prematuros, abortos e natimortos, na infecção materna com *T. cruzi*, a suplementação via oral de Zn demonstrou ser um importante microelemento, pois não causou efeitos colaterais nos parâmetros avaliados e no desenvolvimento gestacional materno e fetal.

3) Avaliação Pós-Natal dos Neonatos

Na infecção materna, podem ocorrer abortamento e feto macerado, prematuridade, natimortalidade, retardo do crescimento intrauterino, deformações em neonatos, com ou sem sintomatologia da doença de Chagas aguda. Nesse sentido, no

presente estudo, foi comprovado que a infecção por *T. cruzi* durante a prenhez prejudicou o desenvolvimento dos neonatos pós-natal, sendo esses efeitos dependentes da cepa utilizada.

Durante período gestacional, quantidade inadequada ou a falta de vitaminas ou minerais, podem prejudicar a gestante (RAMAKRISHNAN et al., 1999). Além disso, podem ocorrer nascimentos de feto prematuro, natimorto, retardamento no crescimento intrauterino, malformações congênitas, problemas imunológicos e anormalidades no desenvolvimento de órgãos (BLACK, 2001).

Após o nascimento, a lactação exerce um eficiente mecanismo maternal para absorver os elementos traços e utilizá-los na síntese do leite. A adequada lactação é essencial para o crescimento infantil e distribuição dos microelementos para os recém nascidos (BEDWAL, BAHUGUNA, 1994).

Apesar dos neonatos permanecerem e amamentarem-se em suas respectivas mães, a suplementação de Zn materno e o leite não causaram alterações no desenvolvimento neonatal dos grupos infectados.

4) Mortalidade das Fêmeas

Na infecção chagásica, a resposta imune protetora desenvolvida para o controle da carga parasitária e sobrevivência do hospedeiro é do tipo Th1 (celular), onde macrófagos ativados produzem TNF- α (Tumor Necrose Factor) que ativam células NK (Natural Killer), que por sua vez produzem IFN- γ (interferon gama) (CARDILLO et al., 1996).

No entanto, a gestação pode afetar o sistema imunológico, assim como, esse sistema pode atuar sobre a gestação, causando conseqüências importantes para as infecções parasitárias.

De acordo com os resultados obtidos, a infecção por *T. cruzi* aumentou significativamente a taxa de mortalidade de todos os grupos experimentais em relação aos grupos controle e a suplementação de Zn não alterou a taxa de mortalidade das fêmeas.

De Souza et al., (2003) também observou que camundongos infectados com *T. cruzi* e que receberam a suplementação de Se, não apresentaram diferenças na sobrevivência em relação ao grupo não suplementado. Sendo assim, apesar de diminuir a parasitemia dos animais, a suplementação de Se não protegeu os animais da morte induzida pela infecção.

Por outro lado, camundongos infectados com *T. cruzi* e que receberam dieta deficiente de Se, demonstraram maior taxa de mortalidade do que o grupo controle. Os grupos deficientes em Se não sobreviveram mais do que 23 dias após a infecção. No entanto, o grupo que recebeu dieta adequada em Se, apenas 20% dos machos morreram 40 dias após a infecção (De SOUZA et al., 2002).

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo e alguns relatos da literatura, indicam que a parasitemia e mortalidade são parâmetros independentes (WRIGHTSMAN et al., 1982).

5)Parasitismo Tecidual

Trypanosoma cruzi é uma parasita capaz de infectar diferentes tipos celulares. Durante a fase aguda da infecção, os parasitas são encontrados facilmente na corrente

sanguínea e replicando-se nos diferentes tecidos (LENZI et al., 1996). A resposta imunológica é estimulada, o elevado parasitismo tecidual é controlado, entretanto, ele não é erradicado. O parasita e o hospedeiro vivem em equilíbrio, similar a outras infecções parasitárias. Este equilíbrio pode ser quebrado durante o estado de imunossupressão, quando o parasitismo pode reaparecer (SARTORI et al., 1998; GALHARDO et al., 1999).

A sobrevivência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, o progresso para a fase crônica, bem como a distribuição do parasita nos tecidos, dependem das características genéticas do hospedeiro e do parasita (Cummins; Tarleton, 2003), além da resposta imune do hospedeiro.

Na corrente sanguínea e nos tecidos, a carga parasitária, depende da efetividade da resposta imune do hospedeiro na destruição do parasito ou na limitação de sua replicação. As variações entre as cepas do parasita podem determinar a carga parasitária, assim como a eficácia da resposta imunológica do indivíduo. Sendo assim, quando o controle imunológico é ineficiente, a carga parasitária e a inflamação, aumentam potencialmente os danos teciduais (TARLETON, 2003).

A doença de Chagas é uma síndrome clínica relacionada com o coração, porém outros tecidos também são afetados por essa enfermidade. O tempo de ocorrência, o tipo de tecido afetado e os tipos de danos, como inflamação, perda das funções nervosas e elasticidade foram similares à patologia observada no coração. Essa similaridade sugere fortemente uma etiologia comum (TARLETON, 2003).

A análise histológica dos diferentes tecidos obtidos de animais experimentais permitiu a visualização de células parasitadas em diferentes órgãos como coração, músculo esquelético, fígado e outros, dependendo do tropismo da cepa estudada (TARLETON; ZHANG, 1999). Da mesma forma, no presente estudo, todos os grupos experimentais,

assim como, seus respectivos tecidos analisados, apresentaram ninhos de formas amastigotas, em intensidade e localização diferenciadas.

Nas fibras cardíacas das fêmeas infectadas, o parasitismo foi mais intenso no grupo de animais infectados com a cepa Bolívia, apresentando maior quantidade de ninhos do que as fêmeas infectadas com a cepa Y, demonstrando dessa forma o acentuado e característico tropismo da cepa Bolívia para a musculatura.

O tropismo para os tecidos musculares pode estar relacionado com a cepa do parasita (MELO, BRENER, 1978; ANDRADE et al. 1999). Por outro lado, as diferenças na resposta imune do hospedeiro podem influenciar no tropismo, dependendo da resistência da cepa inoculada (HIGUCHI et al., 1993; RUSSO et al., 1996; ZHANG; TARLETON, 1999).

Camargos et al. (2000) avaliaram quatro cepas de *T. cruzi* em ratos, e verificaram que essas cepas foram capazes de produzir parasitismo e infiltrados inflamatórios no miocárdio, entretanto, não causaram nenhuma alteração histopatológica no intestino. Além disso, observaram que a parasitemia pode não refletir o parasitismo no coração e em outros órgãos.

Histologicamente, diferentes cepas de camundongos infectados com o clone da cepa Silvio X10/4 de *T. cruzi*, revelaram a presença de formas amastigotas no coração de camundongos da cepa C3H/HePAS, porém parasitas não foram observados nos camundongos A/J.(MARINHO et al., 2004).

De acordo com os dados obtidos para as fêmeas prenhas e não prenhas, foi verificado que a prenhez reduziu o número de ninhos de formas amastigotas nas fibras cardíacas das fêmeas infectadas com a cepa Bolívia.

A intensidade do parasitismo cardíaco pode refletir o parasitismo sistêmico ou a existência de fatores locais que controlam a replicação do parasita no coração (MARINHO et al., 2004).

De acordo com a análise histológica do baço e do fígado, foi observado intenso parasitismo nos grupos de fêmeas não prenhas e prenhas infectadas pela cepa Y, apresentando numerosos ninhos de formas amastigotas.

Este fato pode estar relacionado com a morfologia delgada da cepa Y, que possui maior capacidade de interiorização nos tecidos (CASTRO; BRENER, 1985). Além disso, Miles et al. (1980) classificou essa cepa como grupo *T. cruzi* II, indicando ser mais virulenta em infecções humanas, podendo determinar manifestações graves na doença de Chagas (ZINGALES, 2000).

Por outro lado, as formas largas que predominam na cepa CL de *T. cruzi*, apresentam uma capacidade de interiorização nos tecidos significativamente menor que as formas delgadas predominantes na cepa Y (BERTELLI; BRENER, 1981). Nesse sentido, Schmatz et al. (1983) verificaram que as formas delgadas da cepa Y são muito mais infectantes para as células do que as formas largas.

No fígado, foi verificado que a gestação aumentou significativamente a intensidade do parasitismo tecidual nos grupos infectados com a cepa Y quando comparado com os grupos de fêmeas não prenhas.

De acordo com a análise do parasitismo na placenta, foi observado intenso parasitismo placentário nos grupos experimentais, sendo esse parasitismo maior nas placentas das fêmeas infectadas com a cepa Bolívia do que com a cepa Y. De acordo com os resultados observados, sugere-se que a cepa Bolívia demonstrou tropismo mais acentuado para a placenta.

Esse fato também foi verificado em placentas de animais infectados com as cepas Bolívia e RC, que apresentaram maior tropismo para células da placenta de camundongos, parasitando inclusive células gigantes, enquanto que, os grupos infectados com as cepas Colombiana e Y, o parasitismo tecidual foi menor (MENEGUETTE, 1997).

As diferenças no tropismo placentário entre as cepas de *T. cruzi* e a competência imunológica da placenta em proteger o feto contra a infecção podendo desempenhar importante função na severidade da infecção congênita (ANDRADE, 1992; BITTENCOURT, 1992).

De acordo com a análise do grupo infectado com a cepa Y, o parasitismo ocorreu nas três camadas placentárias, sendo mais intenso na camada labiríntica. Por outro lado, Meneguette (1997) observou que nas placentas do grupo infectado com a cepa Y, o parasitismo foi escasso, comprometendo as células endoteliais da camada decídua.

No grupo da cepa Bolívia, a avaliação histológica está de acordo com os resultados previamente obtidos por Meneguette (1997), onde o parasitismo ocorreu nas três regiões placentárias, sendo mais intenso nas células endoteliais da camada decídua e nas células trofoblásticas gigantes. Na região esponjosa, as placentas do grupo infectado com a cepa Bolívia, o parasitismo foi constituído por ninhos pequenos, enquanto que na região labiríntica, as células apresentaram grandes ninhos de formas amastigotas.

Do mesmo modo, as diferentes populações do parasita influenciaram na infecção de placentas de camundongos, onde o parasitismo placentário foi maior nos animais infectados com a cepa Colombiana do que nos animais infectados com a cepa Y (ANDRADE, 1982).

Mjihdi et al. (2002), estudando as placentas de animais infectados com a cepa Tehuantepec, observaram ninhos de *T. cruzi* principalmente na camada decídua basal,

tendo, entretanto verificado a presença de parasitismo na membrana cório-amniótica, camada esponjosa e raramente na camada labiríntica.

Analisando a transmissão transplacentária da cepa MORC-1 de *T. cruzi* em camundongos, foi verificado que essa cepa apresentou tropismo pela musculatura uterina e pela placenta, pois nos cortes histológicos das placentas foi observado intenso parasitismo em todas as camadas, destacando maior importância para a camada labiríntica, que apresentou grandes ninhos de formas amastigotas (BADRA, 2004).

A análise das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento da placenta em camundongo, entre o 6º e o 18º dias de prenhez demonstrou que o volume placentário teve um aumento constante, porém, o número total de células da placenta atingiu o máximo no 14º dia. As células decíduais, que predominaram na placenta no 6º dia, aumentaram em número até o 10º dia e diminuíram no 14º dia, enquanto que as células trofoblásticas aumentaram linearmente até o 14º dia (IGUCHI et al., 1993).

Sendo assim, as diferenças no parasitismo das camadas placentárias observadas entre as cepas Y e Bolívia, podem estar relacionadas com o dia do inóculo das formas tripomastigotas, pois as fêmeas infectadas com a cepa Bolívia foram inoculadas no 5º dia de gestação, ou seja, no início da formação da placenta. Por outro lado, as fêmeas do grupo da cepa Y foram infectadas no 12º dia, quando as camadas placentárias estão praticamente formadas. Portanto, as diferenças de comportamento do parasito nas diversas regiões da placenta podem estar relacionadas com o período de desenvolvimento das células placentárias com o dia do inóculo do parasita.

Além disso, a capacidade de invasão nas células placentárias pode ser dependente do tipo de cepa utilizada, visto que, algumas cepas podem ser mais patogênicas do que outras, atingindo todas as camadas placentárias e causando intenso parasitismo.

A relação da morfologia das formas do parasito e da suscetibilidade aos anticorpos já foi descrita, relatando que as formas delgadas, ao contrário das formas largas, tiveram maior capacidade de penetração nos tecidos, porém, foram mais suscetíveis à ação dos anticorpos (BRENER, 1969). Entretanto, as cepas Bolívia e RC, que possuem formas predominantemente largas apresentaram maior capacidade de penetração nos tecidos placentários (MENEGUETTE, 1997). Esse fato também foi observado no presente estudo, onde o parasitismo tecidual foi mais intenso nas placentas de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia.

Nas placentas e nos fetos de *M. musculus* infectados pela cepa RAL de *T. cruzi*, foram observadas alterações morfológicas com intenso parasitismo em todas as camadas placentárias, redução no peso e diâmetro das placentas, bem como redução no tamanho e peso dos fetos de camundongos (CARRARO ABRAHÃO, 2000; CARRARO ABRAHÃO et al., 2000 e 2003).

Nesse sentido, Badra (2004) relatou que os ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* presentes em todas as camadas placentárias prejudicaram o desenvolvimento dos fetos, visto que a placenta exerce importantes efeitos no crescimento fetal desde o início da prenhez, devido aos mecanismos metabólicos e endócrinos realizados pela placenta.

No entanto, no presente trabalho, o intenso parasitismo nas camadas placentárias não influenciou no peso e tamanho dos fetos e neonatos, assim como na análise histológica de fetos e dos neonatos das fêmeas infectadas e infectadas suplementadas, não foram observados ninhos de formas amastigotas nos tecidos.

Da mesma forma, camundongos infectados com as cepas Tehuantepec e RAL de *T. cruzi* apresentaram intenso parasitismo em todas as camadas placentárias, no entanto,

não encontraram parasitas nos tecidos fetais (CARRARO ABRAHÃO, 2000; MJIHDI et al., 2002; CARRARO ABRAHÃO et al., 2003).

Entretanto, avaliando 3 casos de mulheres infectadas durante a gestação, Moretti et al. (2005), verificou a ausência de infecção congênita em 2 das mulheres. Desse modo, a carga parasitária não foi o principal fator envolvido na transmissão materno-fetal de *T. cruzi* durante a infecção aguda materna.

Moreno et al. (2003) demonstraram que um pequeno número de filhotes de ratos *Wistar* foi infectado congenitalmente pelo *T. cruzi*, e verificaram que o anticorpo anti-*T. cruzi* pode passar da mãe para o filhote, modificando a resposta imune dos filhotes. Além disso, a patogenicidade das cepas desempenhou importante função na transmissão congênita.

Sendo assim, além da parasitemia, devem existir outros fatores envolvidos na transmissão congênita, provavelmente relacionados à cepa do parasita, idade materna, período gestacional, abortos antecedentes, origem materna e em alguns casos, à reativação da infecção materna durante a gestação devido à imunossupressão (MENEZES et al. 1992; BITTENCOURT, 2000).

Em relação à suplementação de Zn, foi observado que os grupos suplementados apresentaram redução no número de ninhos de formas amastigotas no baço. Do mesmo modo, o coração, o fígado e as placentas de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia demonstraram redução significativa no número de ninhos após a suplementação com Zn. Essa redução na intensidade do parasitismo tecidual, apresentada pelas fêmeas suplementadas com Zn, pode estar relacionada com a ação tripanocida do ZnSO₄, observada na avaliação “*in vitro*” sobre as células infectadas e sobre as formas intracelulares do parasito.

Sendo assim, a suplementação de Zn parece ser um importante fator no controle da carga parasitária tecidual, podendo desempenhar importante papel no controle da doença. Além disso, sem efeitos colaterais para as fêmeas não prenhas e prenhas, para os fetos e os neonatos.

6)Análise de processos inflamatórios

Na doença de Chagas, a patogenia da resposta imune é fonte de controvérsias. A principal hipótese é que patogenia da resposta inflamatória está exclusivamente direcionada com a presença de antígeno de *T. cruzi* (HIGUCHI, 1997; TARLETON, 2001). A segunda hipótese é que a doença de Chagas crônica é uma doença autoimune (LEON; ENGMAN, 2001).

No presente estudo, alterações histopatológicas não foram mensuradas. Entretanto, de acordo com os aspectos histológicos observados nos tecidos analisados foi possível verificar que a infecção promoveu alterações teciduais relacionadas com o intenso parasitismo e com a presença de infiltrados inflamatórios.

Nas fibras cardíacas das fêmeas infectadas com a cepa Y foi visualizada a presença de infiltrado inflamatório difuso e discreto, sem a formação de focos inflamatórios. Na cepa Bolívia, a miocardite foi focal e difusa com infiltrado inflamatório mononuclear mais intenso.

Em relação às fêmeas prenhas infectadas e as fêmeas prenhas infectadas suplementadas, foi observado processo inflamatório difuso discreto nas fibras cardíacas e ocasionalmente formando focos. No entanto, para as fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas, a miocardite foi mais discreta do que nas fêmeas não suplementadas. Na

cepa Y, suplementação de Zn não alterou a intensidade de células inflamatórias nas fibras cardíacas.

De acordo com a análise do parasitismo nas fibras cardíacas, foi verificado que o número de parasitas foi maior no grupo da cepa Bolívia do que nas fêmeas infectadas com a cepa Y. Sendo assim, sugere-se que a presença de processos inflamatórios apresentado pelas fêmeas infectadas com as cepas Y e Bolívia demonstrou correlação com a intensidade do parasitismo tecidual.

Do mesmo modo, Garcia et al. (2005) observaram que camundongos BALB/c infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* apresentaram correlação entre a diminuição da reação inflamatória e o parasitismo no miocárdio dos animais tratados com Benzonidazol.

Assim como, a análise do coração de humanos tem demonstrado uma correlação entre a intensidade inflamatória e o parasitismo, verificado através de técnicas altamente sensíveis, como o PCR e a imunohistoquímica (PALOMINO et al., 2000).

Por outro lado, Andrade (1999) relatou que lesões inflamatórias nos tecidos não demonstraram correlação entre a presença de parasitas e células inflamatórias. Entretanto, utilizando técnicas mais sensíveis na pesquisa de parasitas em áreas com infiltrados inflamatórios, foi observada a relação entre a persistência de *T. cruzi* e a severidade da doença em certos tecidos, como a cardiopatia e o megaesôfago (LAGES-SILVA et al, 2001).

Em hamsters infectados com a cepa VIC de *T. cruzi*, foram observados processos inflamatórios focal e difuso em vários órgãos, caracterizados pela presença de células mononucleares e áreas de fibrose no miocárdio (CABRINE-SANTOS et al., 2001).

Magalhães-Santos et al. (2004), verificaram a intensidade da resposta inflamatória no coração de *Calomys callosus* infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. De acordo com este estudo, observaram que os animais infectados com a cepa Y apresentaram intensa miocardite após 10 dias de infecção, com infiltrado mononuclear difuso e focal, e locais com necrose. Os animais infectados com a cepa 21SF apresentaram após 30 dias de infecção, infiltrado inflamatório moderado de aspecto focal e difuso. Já os animais infectados com a cepa Colombiana demonstraram moderado e difuso infiltrado inflamatório, bem como, infiltrado focal ao redor das células cardíacas necrosadas.

Andrade et al. (1997), observaram que camundongos cronicamente infectados com cepas do tipo I e II apresentaram infiltrado inflamatório focal moderado no coração. Entretanto, os animais infectados com cepas do tipo III, demonstraram intensa reação inflamatória no miocárdio e no músculo esquelético, acompanhado de edema intersticial e eventual presença de amastigotas intracelulares.

No fígado, os resultados obtidos entre os grupos não infectados e os grupos infectados com as cepas Y e Bolívia, demonstraram que a infecção promoveu um aumento significativo no número de infiltrados e no tamanho da área dos processos inflamatórios no tecido hepático em todos os grupos.

Nesse sentido, a análise de processo inflamatório no fígado demonstrou que as fêmeas infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* apresentaram número de infiltrado inflamatório perivascular mais intenso e difuso do que nas fêmeas infectadas com a cepa Bolívia. No entanto, na cepa Bolívia os nódulos inflamatórios apresentaram área maior do que na cepa Y. Sendo assim, as cepas de *T. cruzi* influenciaram na intensidade e na quantidade dos processos inflamatórios hepáticos.

Diferentes cepas de camundongos, cronicamente infectados com o clone da cepa Silvio X10/4, apresentaram lesões inflamatórias em distintos órgãos. Os camundongos da cepa C3H/HePAS demonstraram intensa patologia cardíaca, exibindo baixos níveis de lesões inflamatórias no fígado. Em contraste, camundongos A/J apresentaram intenso infiltrado no fígado, porém não apresentaram lesões inflamatórias no coração. Já os camundongos BALB/c e C57BL/6 demonstraram patologia similar aos camundongos A/J (MARINHO et al., 2004).

Camundongos A/J cronicamente infectados com *T. cruzi*, demonstraram intensa resposta inflamatória no fígado, entretanto, esta resposta pode não estar associada com a presença de parasitas neste tecido. No fígado a presença de processos inflamatórios é determinada pela resposta imune aos antígenos das formas tripomastigotas sanguíneas, que tem sido removidas e destruídas pela fagocitose no fígado (MARINHO et al., 2004).

Entretanto, de acordo com a análise histológica do presente estudo, foi possível observar a presença de parasitas no interior dos processos inflamatórios, assim como, ninhos de formas amastigotas sem infiltrados inflamatórios ao seu redor, em animais infectados com as cepas Y e Bolívia.

Em relação às fêmeas prenhas, foi verificado que a gestação não aumentou o número e o tamanho da área de infiltrados inflamatórios no fígado das fêmeas, visto que, para as fêmeas infectadas não prenhas os nódulos inflamatórios apresentaram-se em maior número nas fêmeas infectadas com a cepa Y, porém abrangeram uma área maior nas fêmeas infectadas com a cepa Bolívia.

A suplementação de Zn reduziu o número de nódulos inflamatórios nos grupos de fêmeas não prenhas infectadas com a cepa Y. Assim como, a suplementação também

reduziu a área dos infiltrados inflamatórios em todos os grupos, principalmente nas fêmeas não prenhas infectadas com a cepa Bolívia.

Em relação às placentas de fêmeas infectadas com ambas as cepas, foi verificado a presença de infiltrados inflamatórios nas camadas placentárias, porém de forma difusa discreta, caracterizando uma placentite moderada. A suplementação de Zn não promoveu alterações teciduais, pois o aspecto placentário de todos os grupos infectados foi similar.

Do mesmo modo, Moreno et al. (2003) verificaram que placentas de ratos infectados com *T. cruzi* apresentaram moderado infiltrado celular e ausência de parasitas no estroma vascular.

Em placentas humanas, foram observados ninhos de formas amastigotas intactos e ausência de células inflamatórias ao redor. Entretanto, quando parasitas foram localizados fora das células, infiltrados inflamatórios foram visualizados nas vilosidades do estroma (ALTEMANI et al., 2000).

Se a persistência do parasita é um fator de direcionamento para a resposta patológica, a associação entre o parasitismo e a resposta inflamatória, deveria ser manifestada em todos os órgãos parasitados (SOARES et al., 2001).

Portanto, de acordo com os resultados obtidos para a análise de processos inflamatórios nos tecidos avaliados, concluiu-se que a intensidade ou a presença do parasita nos tecidos pode ter influenciado na quantidade e qualidade dos processos inflamatórios, assim como, a suplementação de Zn e a gestação não aumentaram os focos de infiltrados inflamatórios, diminuindo as possíveis alterações histopatológicas ocasionadas pela infecção nos tecidos analisados.

7) Avaliação Quantitativa de Zinco Plasmático

Na avaliação de Zn plasmático, foi utilizado o AAS devido à rapidez, baixo custo, sensibilidade e precisão nos resultados. Entretanto, para evitar erros nos resultados obtidos, foi adicionada solução de glicerol nas soluções de calibração. Sendo assim, a viscosidade das amostras de plasma e das soluções de calibração foi similar, garantindo maior precisão nos resultados.

A separação do plasma e do soro sanguíneo é outro fator que pode interferir nos resultados das amostras. Pois, estudos prévios demonstraram que o tempo entre a coleta, a centrifugação e a separação das amostras, aumentou a concentração de Zn. Para a separação do soro do sangue é necessário um tempo de espera maior antes da centrifugação, porém o plasma pode ser separado imediatamente após a coleta do sangue. Por isso, o plasma é preferencialmente utilizado em experimentos para dosagem de Zn (ENGLISH; HAMBIDGE, 1988).

Estudos prévios demonstraram que a rápida centrifugação para a separação do plasma, não afetou a concentração de Zn, assim como, a utilização de citrato ou excesso de Heparina Sódica diminuiu a concentração de Zn das amostras (MAKINO, 1983; SMITH et al., 1985, 1987).

De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que a infecção por *T. cruzi* reduziu a concentração de Zn plasmático de fêmeas prenhas infectadas com ambas as cepas. Esse resultado está de acordo com estudo previamente relatado, onde mudanças na concentração de Zn plasmático ocorreram devido à severidade e o estágio de infecção. Em animais infectados com *T. brucei*, que receberam dieta deficiente em Zn foi observado um

decréscimo na concentração plasmática de Zn e alterações na parasitemia (MWANGI et al., 1995).

Nas fêmeas não prenhas que receberam a suplementação de Zn, não foi observada nenhuma alteração significativa em relação aos grupos não suplementados.

A concentração de Zn plasmático, observada no final da gestação em ratos *Wistar*, foi significativamente diferente entre o grupo que recebeu dieta deficiente de Zn e grupo controle (Travé et al., 1985). Por outro lado, ratos prenhas que receberam alimentação suplementada com 6mgZn/Kg durante a gestação apresentaram aumento significativo na concentração de Zn plasmático quando comparado com o grupo controle (YASDANI et al., 1992).

Estudos demonstraram os benefícios da suplementação de Zn sobre doenças infecciosas em humanos (SHANKAR; PRASAD, 1998). Grupos tratados com Zn apresentaram redução de infecções por agentes oportunistas (MOCHEGANI et al., 1995).

De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que a gestação diminuiu significativamente a concentração de Zn no plasma nos grupos infectados e não suplementados.

Esse fato foi relatado por Jameson (1976), demonstrando que durante a gestação, a concentração de Zn no plasma materno diminui, devido ao aumento do volume plasmático que ocorre na gestação, podendo causar a redução de Zn e albumina.

Alterações nas concentrações de proteínas plasmáticas também podem promover a diminuição dos valores de Zn, uma vez que grande parte de sua concentração corpórea desse micronutriente está ligada às proteínas. A diminuição de Zn na gestação, também pode estar relacionada com as mudanças hormonais, como o aumento dos níveis de

estrógeno e corticosterona (BRANDES et al., 1980; TUTTLE et al., 1985; MARSÁL; FURGYIK, 1987).

Animais experimentais demonstraram que a absorção de Zn aumentou durante a gestação, onde a porcentagem de absorção no 21º. dia foi duas vezes maior do que em fêmeas não prenhas e não lactantes (DAVIES; WILLIAMS, 1977).

A deficiência de micronutrientes e as doenças infecciosas freqüentemente coexistem e demonstram uma complexa interação, causando mutuamente danos clínicos. Essa combinação é predominantemente observada em populações economicamente desprivilegiadas, particularmente em regiões rurais. Vários micronutrientes, como o Zn, Ferro (Fe) e Se, modulam as funções imunológicas e influenciam na suscetibilidade a infecções. A doença de Chagas é um pertinente modelo de estudo da interação entre a nutrição, imunidade e infecção (RIVERA et al., 2003).

Sendo assim, a associação entre o aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e a deficiência nutricional de Zn, levaram pesquisadores a hipotetizar que esse elemento traço é muito importante para a imunidade (Wellington, 2001), auxiliando no controle da infecção.

Diante dos dados obtidos nessa avaliação, a suplementação de Zn não alterou a concentração plasmática de Zn em animais infectados. No entanto, durante a prenhez de camundongos a suplementação de Zn proporcionou um aumento da concentração de Zn plasmático em fêmeas infectadas, podendo auxiliar na resposta imunológica desses animais no controle da carga parasitária.

8) Avaliação Quantitativa de Zinco Tecidual

As causas no desenvolvimento anormal embrionário são multifatoriais. Nesse sentido, Keen et al. (2003) sugeriram que um fator comum que contribuiu para as anormalidades foi à deficiência nutricional de microelementos durante o desenvolvimento embrionário e fetal.

Esses elementos traços são obtidos por meio do sangue materno via placenta (WASOWICZ et al., 1993; LEE et al., 1995). Entretanto, foi verificado que os micronutrientes armazenados nos tecidos maternos também são transportados para o feto (LINDSAY et al., 1994).

A função da MT no metabolismo dos metais é essencial, onde os metais que estão em excesso são seqüestrados por esta proteína. Sendo assim, os metais são raramente encontrados em abundância no meio (VALLEE, 1995).

A ligação de Zn com a MT aumenta quando os animais são expostos a quantidade excessiva de Zn e em casos de deficiência desse micronutriente. Dessa forma, sugerindo que a MT funciona como seqüestradora de Zn em caso de excesso, bem como o Zn armazenado nos tecidos pode ser utilizado em caso de deficiência (KELLY et al., 1996).

O desequilíbrio na composição dos elementos traços ou na acumulação pode ser tóxica ao organismo, podendo causar doenças (YAMAN et al., 2005).

No presente estudo, a concentração de Zn foi muito diferenciada entre os grupos e tecidos analisados. O coração dos grupos infectados por *T. cruzi* apresentou uma redução da quantidade de Zn das fêmeas infectadas não prenhas e prenhas. Nos grupos de fêmeas prenhas, foi verificado que o grupo de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia demonstraram diferença significativa na concentração de Zn cardíaco em relação aos grupos controle.

Em relação aos grupos suplementados, foi verificado que para as fêmeas não prenhas infectadas com a cepa Y, a concentração de Zn no coração aumentou significativamente em relação ao grupo infectado e não suplementado. Assim como, a prenhez aumentou significativamente a concentração de Zn no coração de fêmeas infectadas com a cepa Y, quando comparada com a concentração obtida para o grupo de fêmeas não prenhas infectadas.

No baço, as fêmeas não prenhas infectadas com ambas as cepas de *T. cruzi* demonstraram quantidade de Zn significativamente maior do que nos grupos não infectados. No entanto, os valores obtidos para as fêmeas prenhas infectadas foram semelhantes aos valores dos grupos não infectados.

Entre as fêmeas prenhas e infectadas e não prenhas infectadas, foi observado que a prenhez reduziu a concentração de Zn no baço de fêmeas infectadas com a cepa Bolívia.

A suplementação de Zn aumentou significativamente a concentração de Zn no baço dos animais infectados com a cepa Y, quando comparado com os grupos infectados que não receberam a suplementação. Assim como, comparando os resultados obtidos entre os grupos infectados e suplementados, foi observado uma diferença significativa na concentração entre os grupos infectados com as cepas Y e Bolívia.

No fígado, as fêmeas não prenhas infectadas com as cepas de *T. cruzi* apresentaram maior concentração de Zn do que as fêmeas não prenhas e não infectadas. Por outro lado, nas fêmeas prenhas infectadas a concentração de Zn foi significativamente menor do que nas fêmeas não infectadas.

Desse modo, comparando os resultados obtidos entre as fêmeas prenhas e não prenhas, foi verificado que a prenhez aumentou significativamente a concentração de Zn no

fígado dos grupos em relação às fêmeas não prenhas. Do mesmo modo, a suplementação de Zn aumentou a concentração no fígado de fêmeas prenhas infectadas quando comparada com a concentração obtida para as fêmeas prenhas infectadas e não suplementadas.

Na quantificação de Zn placentário, foi observado que as fêmeas infectadas apresentaram concentração menor do que as fêmeas não infectadas. No entanto, a suplementação de Zn aumentou a concentração desse elemento traço na placenta de camundongos infectados com a cepa Y, quando comparada com a concentração de Zn obtida de fêmeas não suplementadas.

Nos tecidos fetais dos grupos experimentais, foi verificado que os fetos de fêmeas infectadas com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* apresentaram concentração de Zn semelhante a do grupo controle.

A suplementação de Zn aumentou a concentração de Zn nos tecidos fetais no grupo controle e no grupo infectado com a cepa Y. Entretanto, nas fêmeas infectadas com a cepa Bolívia e suplementadas, houve uma redução significativa da concentração de Zn em relação ao grupo controle suplementado.

Comparando os resultados entre os tecidos avaliados, foi observado que o fígado apresentou maior nível de Zn armazenado em todos os grupos experimentais. Nas fêmeas prenhas, as placentas e os fetos também apresentaram elevados níveis de Zn.

Do mesmo modo, Henriques; Cozzolino (2001) observaram que o fígado, os rins e os testículos de ratos demonstram diferenças significativas na concentração e quantidade total de MT, sendo que o fígado apresentou maior concentração entre os tecidos analisados. Esses resultados demonstraram uma direta correlação entre o aumento da concentração de Zn nos tecidos e o aumento dos níveis de MT. Além disso, esses dados comprovam a importância do fígado no metabolismo do Zn e da MT.

Ratos deficientes em Fe e que receberam alimentação adequada em Zn, demonstraram aumento dos níveis de Zn no plasma, no fígado, no baço, nos rins e no fêmur (KAGANDA et al., 2003).

De acordo com os resultados, a suplementação de Zn nos grupos experimentais causou efeitos diferenciados dependendo da cepa e do tecido estudado. Assim como, a concentração de Zn foi muito variada entre os tecidos e os grupos avaliados. Essa variação pode estar relacionada com tipo de tecido, concentração de Zn plasmática, gestação, modelo experimental, presença ou não do parasita, assim como da cepa do parasita utilizada.

9) Avaliação "in vitro" do Sulfato de Zinco em cultura de células

Em ensaios "in vitro" utilizando cultura de células, a absorvância obtida por meio da reação de MTT a Formazan é diretamente proporcional ao número de células. Sendo assim, foi sugerido que apenas as células vivas, constituídas de mitocôndrias ativas, metabolizariam e produziram Formazan (MOSMANN, 1983). Sendo assim, o método colorimétrico reduz o tempo necessário para determinar a atividade de compostos, sendo mais objetivo e confortável para os pesquisadores do que a contagem microscópica (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

A avaliação dos efeitos da exposição a metais pesados sobre a saúde em seres humanos é dependente do conhecimento básico da toxicologia celular e molecular desses metais. O uso de vários tipos celulares tem auxiliado na pesquisa da citotoxicidade. O conhecimento de que, os efeitos agudos e crônicos dos metais ocorrem primeiramente na região dos túbulos proximais renais, células epiteliais do rim de ratos têm proporcionado

um sistema de estudo da toxicidade. Sendo assim, as células epiteliais do rim podem ser utilizadas como ferramenta para a investigação dos efeitos tóxicos de diversas drogas (CHERIAN, 1985).

Com intuito de verificar os efeitos do $ZnSO_4$ sobre as células do hospedeiro, foi realizada a avaliação "*in vitro*". De acordo com essa avaliação, foi verificado que o Zn foi mais tóxico do que o Benzonidazol para o modelo celular utilizado. Essa citotoxicidade pode estar relacionada ao fato de que "*in vitro*", o excesso de Zn não pode ser armazenado pelas células, e conseqüentemente, a alta concentração no meio celular determinou a lise celular.

Em sistemas "*in vivo*", a absorção, o metabolismo e a liberação hepática dependem de uma adequada concentração de Zn nos tecidos, níveis ingerido e quantidade desse micronutriente presente no plasma (Lastra et al., 1997; Seshadri, 2001) para que ocorra uma relação de equilíbrio no organismo, evitando efeitos tóxicos.

Além disso, nesse modelo a MT exerce importantes funções no organismo, como: transporte de metais, desintoxicação promovida pelos metais, proteção contra metais tóxicos, captura e armazenamento de metais livres em excesso, participa do metabolismo dos metais, na resposta imunológica, no controle e armazenamento dos micronutrientes, principalmente de Zn. (LINDSAY et al., 1994; NORDBERG, 1998).

A disponibilidade de MT em resposta ao nível de Zn em cultura de células, bem como nos animais, sugeriu que a MT pode desempenhar importante função na homeostase do Zn. O aumento da síntese de MT em animais expostos ao Zn demonstrou que a MT pode proteger esses animais contra a toxicidade desse microelemento (KELLY et al., 1996).

Além disso, a citotoxicidade de alguns metais em ensaio “*in vitro*” utilizando fibroblastos de camundongos, foi relacionada com o tempo de ensaio. O Cd apresentou efeito citotóxico de 10% após 1 hora de incubação, entretanto, essa porcentagem aumentou para 90% após 6 horas de incubação (BORENFREUND; PUERNER, 1986). Sendo assim, o efeito citotóxico observado nessa avaliação, também pode estar relacionado com o tempo de exposição das células ao ZnSO₄.

Apesar do Zn ser considerado um discreto inibidor da apoptose celular e que a sua deficiência pode induzir a morte de vários tipos celulares (SEVE et al., 2002), esse micronutriente pode ser citotóxico em altas concentrações quando incubado durante um período prolongado em meio celular.

10) Avaliação “in vitro” do Sulfato de Zinco em cultura de células infectadas com T. cruzi

A infecção por *T. cruzi* é um processo complexo que envolve várias moléculas do parasita e do hospedeiro, bem como, envolve várias reações enzimáticas (MAGDESIAN et al., 2001).

Trypanosoma cruzi invade células não fagocíticas através de um mecanismo diferente da fagocitose (SCHENKMAN et al., 1991). A invasão é precedida pelo processo de adesão que inclui moléculas existentes na célula do hospedeiro e do parasita.

Membros da família das glicoproteínas, expressadas na superfície das formas infectantes de *T. cruzi*, estão envolvidas na adesão do parasita e posteriormente na invasão celular (ZINGALES et al., 1982).

Desde a descoberta de que células de vertebrados poderiam ser infectadas por *T. cruzi*, as células passaram a serem utilizadas como modelo “*in vitro*” para determinar a eficácia de novas substâncias sobre diversas doenças, principalmente parasitoses (SANDERSON et al., 1980).

Nesse sentido, a análise “*in vitro*” de substâncias utilizando formas extracelulares (epimastigotas e tripomastigotas) e intracelulares (amastigotas) é de grande importância para averiguação de novas substâncias com potencial tripanocida (MARTINEZ-DIAZ et al., 2000; MUELAS et al., 2002). Diante disso, vários estudos têm sido realizados utilizando as diferentes formas do parasita.

O alopurinol, a 3´deoxipurinas e AZT demonstraram efeitos inibidores na infecção e replicação das formas amastigotas de *T. cruzi* em cultura de células HeLa, exibindo similares resultados em cultura de 3T3 fibroblastos de camundongos (NAKAJIMA-SHIMADA et al., 1996).

Toma et al. (2000), avaliaram a infectividade e a taxa de multiplicação de seis cepas de *T. cruzi* com diferentes níveis de virulência sobre três tipos de células de camundongos. De acordo com os resultados, a taxa de infectividade foi maior em macrófagos peritoniais do que nas células Vero e L929. A elevada taxa de infecção e a baixa multiplicação intracelular dos parasitas observadas em macrófagos pode ser devido a sua capacidade fagocítica comparada com as demais células.

Nessa avaliação, foi verificado o efeito do ZnSO₄ sobre células infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi*. De acordo com os resultados, foi possível observar que a concentração de ZnSO₄ utilizada foi citotóxica.

Além disso, foi verificado que as cepas do parasito apresentaram diferentes respostas ao ZnSO₄. Essa diferenciação já foi relatada, demonstrando que as cepas de *T.*

cruzi diferem em seu comportamento em muitos aspectos e características, como na parasitemia, na mortalidade de camundongos experimentais e na infectividade de macrófagos em sistemas “*in vitro*”, sendo muitas vezes esse comportamento atribuído a algumas características morfológicas das cepas, como por exemplo, a predominância de formas finas ou largas (BRENER, 1980).

Desse modo, a infecção e a intracelular multiplicação dos parasitas, e a eficácia de várias substâncias em ensaios *in vitro* e *in vivo*, variam de acordo com a cepa e tipo de célula utilizada, concentração da substância e duração do tratamento.

11) Avaliação tripanocida “in vitro” do Sulfato de Zinco sobre as formas intracelulares de T. cruzi

A atividade biológica sobre diferentes amostras de *T. cruzi*, não depende apenas das características biológicas ou genéticas da cepa do parasito, como também da forma do parasita empregada no experimento “*in vitro*” (OSAKABE, 2004).

Analisando os efeitos de extratos brutos de *Vernonia sp* sobre as formas amastigotas das cepas Y e Bolívia, Osakabe (2004) verificou que a cepa Y foi mais suscetível, apresentando grande variação na curva dose-reposta. Pois, para a cepa Bolívia foram necessárias concentrações mais altas dos extratos para obter resposta terapêutica das células P388D₁.

No ensaio “*in vitro*” utilizando tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco’s modified Eagle médium), foi verificado que o Selinato de Sódio causou a lise de mais de 50% do parasita. Esta suscetibilidade do parasita

ao Se pode explicar a diminuição da parasitemia observada em camundongos que receberam a suplementação de 16ppm de Se (De SOUZA et al., 2003).

Nesse mesmo sentido, foi verificado o possível efeito tóxico do Zn sobre o parasita. Entretanto, apesar do ZnSO₄ apresentar atividade sobre as formas amastigotas de ambas as cepas do parasito e reduzir a parasitemia de animais suplementados, esse micronutriente não promoveu a cura parasitológica “*in vivo*” e apresentou efeito citotóxico nas concentrações de 100 e 200µg/mL.

O mesmo resultado foi observado em ensaios com antifúngicos como o Cetoconazol e Itraconazol sobre a forma intracelular do parasito, onde essas substâncias apresentaram atividade “*in vitro*”, entretanto foram incapazes de erradicarem o parasito em pacientes infectados e em animais experimentais (McCABE, 1988; MOREIRA et al., 1992; BRENER et al., 1993).

No modelo “*in vitro*” ZnSO₄ apresentou atividade leishmanicida contra as formas promastigotas, amastigotas de culturas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. major* e *L. tropica*, sendo a forma promastigota mais resistente do que as formas amastigotas (axênica e intracelular) (AL-MULLA HUMMADI et al., 2005).

Apesar da atividade “*in vitro*” do ZnSO₄ sobre *Leishmania spp.*, muitos estudos têm sido realizados para tentar descobrir o mecanismo do efeito antileishmanicida do Zn (NAJIM et al., 1998 a, b).

O Zn apresenta efeitos estimulantes do sobre o sistema imune (Prasad, 1979) e tem uma importante função em eventos bioquímicos associados na captura e destruição de parasitas pelos macrófagos (WIRTH et al., 1989). Dessa forma, o Zn parece ter uma dupla ação contra os parasitas intracelulares, demonstrando uma direta ação sobre as formas amastigotas e uma indireta ação através da ativação dos macrófagos do hospedeiro. Esta

indireta atividade possivelmente pode ser resultante da ativação dos ligantes de NADPH-oxidase presentes na membrana dos macrófagos, causando os efeitos oxidativos. Estes efeitos são prejudiciais aos parasitas intracelulares, através da produção de peróxido de hidrogênio (KATAKURA et al., 1985).

Em relação ao Benzonidazol, foi verificado que essa substância não possui efeito significativo sobre a forma amastigota de *T. cruzi*. Provavelmente, esse resultado está relacionado ao fato de que durante a fase crônica da doença de Chagas, quando o parasita está presente no interior das células, o Benzonidazol não promove a cura de pacientes e animais experimentais.

A ineficácia do Benzonidazol sobre o parasito já foi relatada por vários autores, onde observaram que essa substância não causou a porcentagem de lise superior a 50% sobre formas amastigotas (ANDRADE et al., 1983; FILARDI, BRENER, 1987; NEAL, VAN BUEREN, 1988; ANDRADE et al., 1996; SARAIVA, 2003; OSAKABE, 2004).

Diante dos resultados obtidos nas avaliações sobre as células e sobre as formas amastigotas, concluiu-se que a utilização de cultura de células assim como ensaios “*in vitro*” com as formas amastigotas, são importantes para analisar os efeitos das substâncias diretamente sobre as células e sobre a forma intracelular do parasito. Pois muitas vezes a ineficácia de uma nova substância, se deve a citotoxicidade, cepas e formas do parasito.

Além disso, a capacidade tripanocida do Zn sobre as formas amastigotas “*in vitro*”, os efeitos benéficos da suplementação de Zn na redução do parasitismo tecidual, e a ausência de efeitos colaterais sobre os parâmetros maternos e fetais avaliados no presente estudo, demonstraram que a suplementação de Zn pode ser de grande importância para a saúde de indivíduos que vivem em áreas onde a deficiência de Zn e o parasitismo são freqüentemente endêmicos.

VIII.CONCLUSÃO

- *In vitro* e *in vivo*, a eficácia do tratamento ou da suplementação de Zn variou de acordo com o modelo experimental, a cepa do parasito, o tipo de tecido avaliado, o tipo de célula utilizada e a concentração da substância.
 - Histologicamente, a suplementação de Zn parece ser um importante fator no controle da carga parasitária tecidual, podendo controlar a doença.
 - Na análise de processos inflamatórios, a intensidade ou a presença do parasita pode ter influenciado na quantidade e na qualidade dos processos inflamatórios, assim como, a suplementação de Zn e a gestação diminuíram os focos inflamatórios.
 - A concentração de Zn foi muito variada no plasma e nos tecidos analisados. Essa variação pode estar relacionada com o tipo de tecido, gestação, modelo experimental, infecção e cepa do parasito utilizada. Pois em vários parâmetros, as cepas de *T. cruzi* demonstraram distintos resultados.
 - Apesar da citotoxicidade apresentada pelo Zn nos ensaios *in vitro*, esse micronutriente não causou efeitos colaterais nos parâmetros maternos e fatais avaliados, assim como, não prejudicou o desenvolvimento gestacional.
-

- Sendo assim, a suplementação de Zn pode ter grande importância em áreas onde a deficiência de Zn e o parasitismo são frequentemente endêmicos.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIM, G.; COLLI, W.; SOUZA, W., ALVES, M.J. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 35, p. 229-38, 1989.

ADAMSON, S.L.; LU, Y.; WHITELEY, K.J.; HOLMYARD, D.; HEMBERGER, M. PFARRER, C.; CROSS, J.C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.*, v. 250, p. 358-73, 2002.

ADAMSON, S.L.; WHITELEY, K.J.; LU, Y.; CROSS, J.C. Structure of the maternal circulation of the mouse placenta. *Placenta*, v. 21, p. A87, 2000.

ALCÂNTARA, A.; BRNER, Z. The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop.*, v. 35, p. 209-19, 1978.

AL-MULLA HUMMADI, Y.M.; NAJIM, R.A.; AL-BASHIR, N.M. The mechanism behind the antileishmanial effect of zinc sulphate. I. An in vitro study. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 99, p. 27-36, 2005.

ANDRADE, A.L.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA SILVA, S.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L.R.; ALMEIDA, I.C.; ANDRADE, S.S.; ANDRADE, J.G.; MARTELLI, C.M. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, v. 348, p.1407-13, 1996.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 100, p. 163-72, 1999.

ANDRADE, S.G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 18, p. 140-44, 1976.

ANDRADE, S.G. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 76, p. 123-28, 1982.

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

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, p. 721-26, 1983.

ANDRADE, S.G.; CARNEIRO FILHO, A.; De SOUZA, A.J.M.; LIMA, E.S.; ANDRADE, Z.A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Exp. Path.*, v. 78, p. 391-99, 1997.

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

ASHWORTH, C.J.; ANTIPATIS, C. Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction*, v. 17, p. 858-67, 2001.

BADRA, E.S. Estudo da transmissão transplacentária de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* isolada do morcego *Myotis nigricans nigricans*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

BAUM, M.K.; SHOR-POSNER, G.; CAMPA, A. Zinc Status in Human Immunodeficiency Virus infection. *J. Nutr.*, v. 130, p. 1421S-23S, 2000.

BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*, v. 50, p. 626-40, 1994.

BERTELLI, M.S.M.; BRNER, Z. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, v. 66, p. 992-97, 1981.

BERTRAND, G.; JAVILLIER, M. Influence du zinc et du manganèse sur la composition minérale de *Aspergillus niger*. *CR Acad. Sci.*, v. 152, p. 1337-40, 1974.

BICE, D.E.; ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.*, v. 56, p. 663-70, 1970.

BIRCKNER, V. The zinc content of some food products. *J. Biol. Chem.*, v. 38, p. 191-203, 1919.

BITTENCOURT, A.L. Congenital Chagas' disease. *Amer. J. Dis. Child.*, v. 130, p. 97-103, 1976.

BITTENCOURT, A.L. Doença de Chagas congênita na Bahia. *Rev. Baiana Saúde Pública*, v. 11, p. 159-209, 1984.

BITTENCOURT, A.L. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: MACLEOD, C. *Parasitic infections in pregnancy and the newborn*. New York, Oxford Med. Publ., p. 62-86, 1988.

BITTENCOURT, A.L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' Disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 34, p. 403-8, 1992.

BITTENCOURT, A.L. Mecanismos de transmissão. Em: BITTENCOURT, A.L.(ed). *Infecções congênitas transplacentária*. Rio de Janeiro: Revinter, p.9-13, 1995.

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

BLACK, R.E. Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68 (suppl), p. 476S-79, 1998.

BLACK, R.E. Micronutrients in pregnancy. *British J. Nutr.*, v. 85 (suppl.), p. S193-97, 2001.

BLANCO, B.S.; SEGURA, E.L.; CURA, E.N.; CHUIT, R.; TULIÁN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, J.F.; GÜTLER, R.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: na operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop. Med. Int. Health*, v. 5, p. 293-301, 2000.

BLOXAM, D.L.; BAX, C.M.R. Zinc deficiency and abnormal fetal development: assessment of maternal or fetal zinc status. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, p. 1078, 1996.

BONDS, D.R.; MWAPE, B.; KUMAR, S.; GABBE, S.G. Human fetal weight and placental weight growth curves. A mathematical analysis from a population at sea level. *Biol. Neonate*, p. 45, 1984.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicol.*, v. 39, p. 121-34, 1986.

BOSCHETTI, M.A.; PIRAS, M.M., HENRIQUEZ, D., PIRAS, R. Interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v 24, p. 175-84, 1987.

BRANDES, J.M.; LIGHTMAN, A.; ITSKOVITZ, J.; ZINDER, O. Zinc concentration in gravida's serum and amniotic fluid during normal pregnancy. *Biol. Neonate*, v. 38, p. 66-70, 1980.

BRENER, Z. Therapeutic activity an criterion of cure on mice experimental infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4, p. 389-96, 1962.

BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 63, p. 215-20, 1969.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, v. 18, p. 247-92, 1980.

BRENER, Z. O parasita e relações hospedeiro-parasita. In: BRENER, Z. & ANDRADE Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, p. 1-41, 2000.

BRENER, Z.; CANÇADO, J.R.; GALVÃO, L.M. An experimental and clinical assay with ketoconazole in treatment of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 149-53, 1993.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 5, p. 220-24, 1983.

BURTON, G.J.; HEMPSTOCK, L.; JAUNIAUX, E. Nutrition of the human fetus during the first trimester – a review. Placenta, v. 22, p. S70-76, 2001.

BUTRIMOVITZ, G.P.; PURDY, W.C. The determination of zinc in blood plasma by atomic absorption spectrometry. Anal. Chim. Acta, v. 94, p. 63-73, 1977.

CABRINE-SANTOS, M.; LAGES-SILVA, E.; CHAPADEIRO, E.; RAMIREZ, L.E. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Exp. Parasitol., v. 99, p. 160-67, 2001.

CAMARGOS, E.R.S.; FRANCO, D.J.; GARCIA, C.M.M.G.; DUTRA, A.P.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.L.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R.S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 62, p. 604-12, 2000.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. Infec. Immun., v. 64, p. 128-34, 1996.

CARLIER, Y.; RIVERA, M.T.; TRUYENS, C.; GOLDMAN, M., LAMBERT, P., FLAMENT, J., BAUWENS, D., VRAY, B. Pregnancy and humoral immune response in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. Infec. Immun., v. 55, p. 2496-501, 1987.

CARLIER, Y.; RIVERA, M.T.; TRUYENS, C.; PUISSANT, F.; MILAIRE, J. Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 37, p. 534-40, 1987.

CARRARO-ABRAHÃO, A.A. Estudo morfológico, morfométrico e esteriológico da placenta e tecidos fetais, na transmissão transplacentária de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CARRARO-ABRAHÃO, A.A.; LOPES, R.A.; SALA, M.A.; RIBEIRO, R.D. Placental alterations of Swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 95 (Suppl. II), p.122, 2000.

CARRARO-ABRAHÃO, A.A.; MENEGUETTE, C.; SALA, M.A.; LOPES, R.A. Histological and morphometric investigations of changes induced by the RAL strain of *Trypanosoma cruzi* in the mouse placenta. Braz. J. Pharm. Science, v. 39, p. 169-76, 2003.

CASEY, C.E.; NEVILLE, M.C.; HAMBIDGE, K.M. Studies in human lactation: secretion of zinc, copper and manganese in human milk. Am. J. Nutr., v. 49, p. 773-85, 1989.

CASTRO, M.A.P.; BRENER, Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em Cães inoculados com duas diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 18, p. 223-29, 1985.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen.n.sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 1, p. 161-218, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 3, p. 219-75, 1911.

CHERIAN, M.G. Rat kidney epithelial cell culture for metal toxicity studies. In Vitro Cell Dev. Biol., v. 21, p. 505-8, 1985.

COOK-MILLS, J.M.; WIRTH, J.J.; FRAKER, P.J. Possible roles for zinc destruction of *Trypanosoma cruzi* by toxic oxygen metabolites produced by mononuclear phagocytes. Adv. Exp. Med. Biol., v. 262, p. 111-21, 1990.

COURA, J.R.; BARRETTO, T.V.; NARANJO, M.A. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 27, p. 251-53, 1994.

CROFT, S.L., URBINA, J.A., BRUN, R. Chemotherapy of human leishmaniasis and trypanosomiasis. In: G. Hide, JC Mottram, GH Coombs, PH holmes (eds), Trypanosomiasis and Leishmaniasis Biology and Control, Cab International, Wallingford, Oxon, p. 245-57, 1997.

CROSS, J.C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. Cell. Develop. Biol., v. 11, p. 105-13, 2000.

CROSS, J.C.; WERB, Z.; FISHER, S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. Science, v. 266, p. 1508-18, 1994.

CROSS, J.C.; BACZYK, D.; DOBRIC, N.; HEMBERGER, M.; HUGHES, M.; SIMMONS, D.G.; YAMAMOTO, H.; KINGDOM, J.C.P. Genes, development and evolution of the placenta. Placenta, v. 24, p. 123-30, 2003.

CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem Parasitol.*, v. 129, p. 53-9, 2003.

CUNHA, D.F.; CUNHA, S.F.C. Microminerais. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. *Ciências Nutricionais*. 1^a. ed., SARVIER, São Paulo, p. 141-66, 2000.

DASTON, G.P. Fetal zinc deficiency as a mechanism for cadmium induced toxicity to the developing rat lung and pulmonary surfactant. *Toxicol.*, v. 24, p. 55-63, 1982.

DAVIES, N.T.; WILLIAMS, R.B. The effect of pregnancy and lactation on the absorption of zinc and lysine by the rat duodenum in situ. *Br. J. Nutr.*, v. 38, p. 417-23, 1977.

De DIEGO, J.A.; PALAU, M.T.; GAMALLO, C.; PENIN, P. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Int. Health*, v. 3, p. 222-33, 1998.

De SOUZA, A.P.; OLIVEIRA, G.M; NEVE, J.; VANDERPAS, J.; PIRMEZ, C.; CASTRO, S.L.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; RIVERA, M.T. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. *Exp. Parasitol.*, v. 101, p. 193-99, 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. *Parasitol. Res.*, v. 91, p. 51-54, 2003.

DIAS, J.C.P. Controle da doença de Chagas. In: DIAS, J.C.P.; COURA (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, p. 453-68, 1997.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia: In : Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um manual prático para o Clínico Geral, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, p. 33-66, 1997.

DILTS, P.V.; AHOKAS, R.A. Effects of dietary lead and zinc on fetal organ growth. Am. J. Obstet. Gynecol., v. 136, p. 889-95, 1980.

D'IMPERIO LIMA, M.R.; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J. Immun., v. 137, p. 353-56, 1986.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. The metabolism and mode of action of gentian violet. Drug Metab Rev., v. 22, p. 161-78, 1990.

DOST, C.K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO Jr., J.C. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. Parasitol. Res., v. 88, p. 609-16, 2002.

DVORAK, J.A.; HOWE, C.L. The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells in vitro. J. Protozool, v. 23, p. 534-7, 1976.

EBERT, D.; HERRE, E.A. The evolution of parasitic disease. Parasitol. Today, v. 12, p. 96-101, 1996.

ELIZAGA, V.; FERREIRA, R.M.C.D. Zinc, pregnancy and parturition. *Acta Pediatr. Scand*, v. 319(Suppl), p. 150-57, 1985.

ENGLISH, J.L.; HAMBIDGE, M. Plasma and serum zinc concentrations: effect of time between collection and separation. *Clin. Chim. Acta*, v. 175, p. 211-16, 1988.

FEILER, L.S.; SMOLIN, G.; OKUMOTO, M.; CONDON, D. Herpetic keratitis in zinc deficient rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 22, p. 788-95, 1982.

FENWICK, P.K.; AGGETT, P.J.; MACDONALD, D.C.; HUBER, C.; WAKELIN, D. Zinc deprivation and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Strongyloides ratti*. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 52, p. 173-77, 1990a.

FENWICK, P.K.; AGGETT, P.J.; MACDONALD, D.C.; HUBER, C.; WAKELIN, D. Zinc deprivation and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Trichinella spiralis*. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 52, p. 166-72, 1990b.

FERNANDES O.; SOUTO R.P.; CASTRO J.A.; PEREIRA J.B.; FERNANDES N.C.; JUNQUEIRA A.C.; NAIFF R.D.; BARRETT T.V.; DEGRAVE W.; ZINGALES B.; CAMPBELL D.A.; COURA J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58, p. 807-11, 1998.

FERRIOLI FILHO, F.; BARRETO, M.P.; CARVALHEIRO, J.R. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXIV - variação dos dados biométricos obtidos de amostras do *T.cruzi* isoladas de casos humanos de doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 2, p. 1-8, 1968.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 755-59, 1987.

FLAGSTAD, T.; ANDERSEN, S.; NIELSEN, K. The course of experimental *Fasciola hepatica* infection in calves with a deficient cellular immunity. *Rev. Vet. Sci.*, v. 13, p. 468-75, 1972.

FORBES, R.M. Life of laboratory animals to define physiological functions and bioavailability of zinc. *Fed. Proc.*, v. 43, p. 2835-39, 1964.

FOSMIRE, G.J. Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 51, p. 225-27, 1990.

FRAKER, P.J.; CARUSO, R.; KIERSZENBAUM, F. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection by *Trypanosoma cruzi*. *J. Nutr.*, v. 112, p. 1224-29, 1982.

FRAKER, P.J.; HILDEBRANT, K., LUECKE, R.W. Alteration of antibody mediated response of suckling mice to T cell-dependent and independent antigens by maternal marginal zinc deficiency: restoration of responsivity by nutritional repletion. *J. Nutr.*, v. 114, p. 170, 1984.

FRAKER, P.J.; JARDIEU, P.; COOK, J. Zinc deficiency and immune function. *Arch. Dermatol.*, v. 123, p. 1699-701, 1987.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press., cap. 46, p. 613-58, 1994.

FREILIJ, H.; ALTCHER, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infec. Dis.*, v. 21, p. 551-55, 1995.

FUNAYAMA, G.K.; PRADO JÚNIOR, J.C. Estudos dos caracteres de uma amostra boliviana do *T.cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 8, p. 75-81, 1974.

FUNG, E.B.; RITCHIE, L.D.; WOODHOUSE, L.R.; ROEHL, R.; KING, J.C. Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: a longitudinal study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 66, p. 80-88, 1997.

GALHARDO, M.C.G.; MARTINS, I.A.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S.S.; COELHO, J.M.C.; VASCONCELOS, A.C.V.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, p. 291-94, 1999.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O. SENRA, J.F.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B.P. Treatment with Benznidazole during the Chronic phase of experimental Chagas' disease cardiac alterations. *Antimicrob. Ag. Chemoth.*, p. 1521-28, 2005.

GARG, H.K.; SINGHAL, K.C.; ARSHAD, Z. A study of the effect of oral zinc supplementation during pregnancy on pregnancy outcome. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 37, p. 276-84, 1993.

GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A.C.; BURTON, G.J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, v. 23, p. 3-19, 2002.

GOLDENBERG, R.L.; TAMURA, T.; NEGGERS, Y. The effects of zinc supplementation on pregnancy outcome. *JAMA*, v. 274, p. 463-68, 1995.

GOLDEN, M.H.N.; GOLDEN, B.E. Trace elements: potencial importance in human nutrition with particular reference to zinc and vanadium. *Br. Med. Bull.*, p. 31-36, 1981.

GONZALES, Z.; CAPPA, S.M.; MIRKIN, G.A.; SOLANA, M.E.; TEKIEL, V.S. *Trypanosoma cruzi* pathology. Strain dependent? *Medicine (B Aires)*, v. 59 (suppl), p. 69-74, 1999.

GOZZO, M.L.; COLACICCO, L.; CALLA, C.; BARBARESI, G.; PARRONI, R.; GIARDINA, B.; LIPPA, S. Determination of copper, zinc, and selenium in human plasma and urine samples by potentiometric stripping analysis and Constant current stripping analysis. *Clin. Chim. Acta*, v. 285, p. 53-68, 1999.

GULBIS, B.; JAUNIAUX, E.; COTTON, F.; STORDEUR, P. Protein and enzyme patters in the fluid cavities of the first trimester gestation sac: relevance to the absorptive role of the secondary yolk sac. *Hum. Reprod.*, v. 4, p. 857-62, 1998.

GÜTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E. Congenital transission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 9, p 29-35, 2003.

HALSTEAD, J.A.; SMITH Jr, J.C.; IRWIN, M.I. Research on zinc requeriments of man. *J. Nutr.*, v. 104, p. 347-78, 1974.

HENRIQUES, G.S.; COZZOLINO, S.M.F. Determination of Metallothionein levels in tissues of Young rats fed zinc-enriched diets. *Rev. Nutr.*, v. 14, p. 163-69, 2001.

HERNANDEZ-MATHESON, I.M.; FRANKOWSKI, R.F.; HELD, B. Foeto-maternal morbidity in the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 77, p. 405-11, 1983.

HIGUCHI, M.L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 39, p 53-60, 1997.

HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C., PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. Cardio. Pathol., v. 2, p. 101-6, 1993.

HUNT, I.F.; MURPHY, N.J.; CLEAVER, A.E. Zinc supplementation during pregnancy: effects on selected blood constituents and on progress and outcome of pregnancy in low-income women of Mexican descent. Am. J. Clin. Nutr., v. 40, p. 508-21, 1984.

IGUCHI, T.; TANI, N.; SATO, T.; FUKATSU, N.; OHTA, Y. Developmental changes in mouse placental cells from several stages of pregnancy in vivo and in vitro. Biol. Reprod., v. 48, p. 188-96, 1993.

JACKSON, M.J.; GIUGLIANO, R.; GIUGLIANO, L.G.; OLIVEIRA, E.F.; SHRIMPTON, R. Stable isotope metabolic studies of zinc nutrition in slum-dwelling lactating women in the Amazon valley. Br. J. Nutr., v. 59, p. 193-203, 1988.

JACKSON, M.J.; LOWE, N.M. Physiological role of zinc. Food Chem., v. 43, p. 233-38, 1992.

JAMESON, S. Zinc and copper in Pregnancy. Correlations to fetal and maternal complications. Acta Med. Scand. Suppl. v. 593, p. 5-77, 1976.

JAMESON, S. Zinc status in pregnancy: the effect of zinc therapy on perinatal mortality, prematurity and placental ablation. Ann. N. York Acad. Science, v. 678, p. 178-92, 1993.

JONSSON, B.; HAUGE, B.; LARSEN, M.F.; HALD, F. Zinc supplementation during pregnancy. Acta Obstet. Gynecol. Scand., v. 75, p. 725-29, 1996.

KAGANDA, J.; MATSUO, T.; SUZUKI, H. Development of iron deficiency decreases zinc requirement of rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., v. 49, p. 234-40, 2003.

KANBARA, H.; NAKABAYASHI, T. Comparative studies on trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from infected mouse blood and infected fibroblast cell (L-cell) culture. Biken. J., v. 26, p. 57-62, 1983.

KATAKURA, K.; MAKOTA, A.; KOBAYASHI, A. In vitro killing of *Leishmania donovani* by Tetrahymena activated macrophages. Med. Journal, v. 32, p. 181-87, 1985.

KEEN, C.L.; TAUBENECK, M.W.; DASTON, G.P.; ROGERS, J.M.; GERSHWIN, M.E. Primary and secondary zinc deficiency as factors underlying abnormal CNS development. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 678, p. 3-47, 1993.

KEEN, C.L.; HANNA, L.A.; LANOUE, L.; URIU-ADAMS, J.Y.; RUCKER, R.B.; CLEGG, M.S. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. J. Nutr., v. 133 (Suppl. 5), p. 1477S-80S, 2003.

KELLY, E.J.; QUAIFFE, C.J.; FROELICK, G.J.; PALMITER, R.D. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J. Nutr.*, v. 26, p. 1782-90, 1996.

KIDD, M.T.; QURESHI, M.A.; FERKET, P.R.; THOMAS, L.N. Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys. Zinc-methionine, immunity and *Salmonella*. *Bio. Trace. Elem. Res.*, v. 42, p. 217-29, 1994.

KING, J.C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am. J. Nutr.*, v. 71 (suppl), p. 1334S-43, 2000a.

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

KIRSHHOFF, L.V. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Curr. Op. Infect. Dis.*, v. 7, p. 542-46, 1994.

KLEIN, C.J.; MOSER-VEILLON, P.B.; DOUGLASS, L.W.; RUBEN, K.A.; TROCKI, O. A longitudinal study of urinary calcium, magnesium, and zinc excretion in lactating and nonlactating postpartum women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 61, p. 779-86, 1995.

KLOETZEL, J.K.; MILDER, R.V.; UMEZAWA, E.S. *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 26, p. 179-85, 1984.

KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immun.*, v. 128, p. 2009-12, 1982.

KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 76, p. 334-40, 1982.

LADIPO, O. A. Nutrition in pregnancy: mineral and vitamin supplements. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.72 (suppl), p. 280S-90S, 2000.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIRES, L.E.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, p. 435-41, 2001.

LASTRA, M.D.; PASTELIN, R.; HERRERA, M.A.; ORIHUELA, V.D.; AGUILAR, A. E. Increment of Immune Responses in Mice Perinatal Stages After Zinc Supplementation. *Arch. Med. Res.*, v. 28, p. 67-72, 1997.

LAZEBNIK, N.; KUHNERT, B.R.; KUHNERT, P.M.; THOMPSON, K.L. Zinc status, pregnancy complications, and labor abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 158, p. 161-66, 1988.

LEE, A.M.; HUEL, G.; GODIN, J.; HELLIER, G.; SAHUQUILLO, J.; MOREAU, T.; BLOT, P. Inter-individual variation of selenium in maternal plasma, cord plasma and placenta. *Sci Total Environ.*, v. 159, p. 119-27, 1995.

LEE, C.M.; HUMPHREY, P.A.; ABOKO-COLE, G.E. Interaction of nutrition and infection: effect of zinc deficiency on resistance to *Trypanosoma musculi*. *Int. J. Biochem.*, v. 15, p. 841-47, 1983.

LEISER, R.; KREBS, C.; EBERT, B.; DANTZER, V. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans. *Microsc. Res. Tech.*, v. 38, p. 76-87, 1997.

LENZI, H.L.; OLIVEIRA, D.N.; LIMA, M.T.; GATTASS, C.R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp. Parasitol.*, v. 84, p. 16-27, 1996.

LEON, J.S.; ENGMAN, D.M. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, p. 555-61, 2001.

LIMA, V.S.; MANGIA, R.H.R.; CARREIRA, J.C.; MARCHEWSKI, R.S.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: correlation of biological aspects of the cycle in mice and Triatomines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 397-402, 1999.

LINDSAY, Y.; DUTHIE, L.M.; MCARDLE, H.J. Zinc levels in the rat fetal liver are not determined by transport across the placental microvillar membrane or the fetal liver plasma membrane. *Biol. Reprod.*, v. 51, p. 358-65, 1994.

LISKA, S.K.; KERKAY, J.; PEARSON, K.H. Determination of zinc in whole blood, plasma and serum using Zeeman effect flame atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta*, v. 151, p. 237-43, 1985.

LUTEROTTI, S.; ZANIC-GRUBISIC, T.; JURETIC, D. Rapid and simple method for the determination of Copper, Manganese and Zinc in rat liver by Direct Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Analyst.*, v. 117, p. 141-43, 1992.

MACEDO A.M.; MARTINS M.S.; CHIARI E.; PENA S.D. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. Mol. Biochem. Parasitol., v. 55, p. 147-53, 1992.

MACEDO A.M.; PENA S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol. Today, v. 14, p. 119-24, 1998.

MAGALHÃES-SANTOS, I.F.; SOUZA, M.M.; LIMA, C.S.C.; ANDRADE, S.G. Infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* Biodemes: Pathogenicity, histotropism, and fibrosis induction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 99, p. 407-13, 2004.

MAGDESIAN, M.H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its host cell receptor. J. Biol. Chem., v. 276, p. 19382-89, 2001.

MAKINO, T. A pontential problem on comparison of plasma with serum for zinc content. Clin. Chem., v. 29, p. 1313-14, 1983.

MARINHO, C.R.F.; BUCCI, D.Z.; DAGLI, M.L.Z.; BASTOS, K.R.B.; GRISOTTO, M.G., SARDINHA, L.R.; BAPTISTA, C.R.G.M.; GONÇALVES, C.P.; DÍMPÉRIO LIMA, M.R.; ÁLVAREZ, J.M. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas Disease. Infec. Imm., p. 2350-57, 2004.

MARSAL, K.; FURGYIK, S. Zinc concentrations in maternal blood during pregnancy and post partum, in cord blood and amniotic fluid. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, v. 66, p. 653-56, 1987.

MARTINEZ-DIAZ, R.A.; ESCARIO, J.A.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GOMEZ-BARRIO, A. Evaluation of drug activity against intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* employing enzyme immunoassay. *J. Clin. Pharm. Ther.*, v. 25, p. 43-47, 2000.

McCABE, R.E. Failure of Ketoconazole to cure chronic murine Chagas disease. *J. Infect. Dis.*, v. 158, p. 1408-9, 1988.

MELO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, v. 64, p. 475-82, 1978.

MENEGUETTE, C. Estudo experimental da Transmissão Transplacentária da infecção aguda e das alterações placentárias causadas por várias cepas de *Trypanosoma cruzi* em camundongos fêmeas (*Mus musculus*). Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP, 1997.

MENEZES, C.A.S.; BITTENCOURT, A.L.; MOTA, E.; SHERLOCK, I.; FERREIRA, J. Avaliação da parasitemia em mulheres portadores de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* durante e após a gestação. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 25, p. 109-13, 1992.

MILES, M.A.; LANHAN, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enymic characteres of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, p: 221-37, 1980.

MJIHDI, A.; LAMBOT, M.A.; STEWART, I.J.; DETOURNAY, O.; NOËL, J.C.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Path.*, v. 161, p. 673-80, 2002.

MOCHEGANI, E.; VECCIA, S.; ANCARANI, F.; SCALISE, G.; FABRIS, N. Benefic of oral zinc supplementation as an adjunct to zidovudine therapy against opportunistic infections in AIDS. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 17, p. 719-27, 1995.

MOREIRA, A.A.B.; De SOUZA, H.B.W.T.; AMATO NETO V. Avaliação terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas experimental e humana pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 34, p. 177-80, 1992.

MORENO, E.A.; RIVERA, I.M.; MORENO, S.C.; ALARCON, M.E., LUGO-YARBUH, A. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of infection. *Invest. Clin.*, v. 44, p. 241-54, 2003.

MORETTI, E.; BASSO, B.; CASTRO, I.; PAEZ, M.C.; CHAUL, M.; BARBIERI, G.; FEIJOO, D.C.; SARTORI, M.J.; PAEZ, R.C. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 53-55, 2005.

MOSER-VEILLON, P.B.; PATTERSON, K.Y.; VEILLON, C. Zinc absorption enhanced during lactation. *FASEB J.*, v.9, p. A729, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *JIM*, p. 55-64, 1983.

MUELAS, S.S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting a Colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol. Res., v. 86, p. 999-1002, 2000.

MUELAS, S.S.; SUÁREZ, M., PÉREZ, R., RODRÍGUEZ, H., OCHOA, C. ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. In vitro and in vivo assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5- thiadiazin – 2 – thione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97, p. 269-72, 2002.

MWANGI, S.M.; McODIMBA, F.; LOGAN-HENFREY, L. The effect of *Trypanosoma brucei* infection on rabbit plasma iron and zinc concentrations. Acta Trop., v. 59, p. 283-91, 1995.

NAJIM, R.A.; SHARQUIE, K.E. Zinc sulphate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an vitro and animal study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 93, p. 831-37, 1998a.

NAJIM, R.A.; SHARQUIE, K.E.; TURKI, K.M.; FARJOU, I.B. The in vitro effect of zinc against *Leishmania donovani*. J. Fac. Med., v. 40, p. 29-34, 1998b.

NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. Antimicrob. Ag. Chemother., p. 2455-58, 1996.

NAWAR, O.; AKRIDGE, R.E.; HASSAN, E.; EL-GAZAR, R.; DOUGHTY, B.L.; KEMP, W.M. The effect of zinc deficiency on granuloma formation, liver fibrosis, and antibody responses in experimental schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 47, p. 383-9, 1992.

NEAL, R.A., VAN BUEREN, J. Comparastive studies of drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* “in vivo” and “in vitro”. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 82, p. 709-14, 1988.

NEGGERS, Y.H.; CUTTER,G.R.; ACTON, R.T.; ALVAREZ, J.O.; BONNER, J.L.; GOLDENBERG, R.L.; GO, R.C.P.; ROSEMAN, J.M. A positive association between maternal serum zinc concentration and birth weight. Am. J. Clin. Nutr., v. 51, p. 678-84, 1990.

NISIDA, L.V.V.; AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; DUARTE, M.I.S.; UMEZAWA, E.S. A survey of congenital Chagas´disease, carried out at three health institutions in São Paulo city, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 41, p. 305-11, 1999.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. Talanta v.46, p.243-54, 1998.

OSAKABE, A.L. Potencial tripanocidad de diferentes espécies vegetais do gênero *Vernonia* (Asteraceae) sobre diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2004.

OSENDARP, S.J.; VAN RAAIJ, J.M.; DARMSTADT, G.L.; BAQUI, A.H.; HAUSTVAST, J.G.; FUCHS, G.J. Zinc supplementation during pregnancy and effects on growth and morbidity in low birthweigh infants: a randomised placebo controlled trial. Lancet, v. 57, p. 1080-85, 2001.

PALOMINO, S.A.; AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L. Systematic mapping of hearts from chonic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological

lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. Ann. Trop. Med. Parasitol., v. 94, p. 571-79, 2000.

PANEMANGALORE, M.; BANERJEE, D.; ONOSAKA, S.; CHERIAN, M.G. Changes in the intracellular accumulation and distribution of Metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. Dev. Biol., v. 97, p. 95-102, 1983.

PASSEY, R.B.; MALUF, K.C.; FULLER, R. Quantitation of zinc in nitric acid-digested plasma by atomic absorption spectrophotometry. Analyt. Biochem., v. 151, p. 462-65, 1985.

PEKAREK, R.; HOAGLAND, A.; POWANDA, M. Humoral and cellular immune responses in zinc-deficient rats. Nutr. Rep. Int., v. 16, p. 267-76, 1977.

PEREIRA DA SILVA, L.H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clín. Biol., v. 20, p. 191-208, 1953.

PIJNENBORG, R. The placental bed. Hypertens. Pregnancy, v. 15, p. 7-23, 1996.

PIJNENBORG, R.; ROBERTSON, W.B.; BROSENS, I.; DIXON, G. Trophoblastic invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. Placenta, v. 2, p. 71-92, 1981.

PRASAD, A.S. Clinical, biochemical and pharmacological roles of zinc. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol, v. 20, p. 393-426, 1979.

PRASAD, A.S. Clinical, biochemical and nutritional spectrum of zinc deficiency in human subjects: an update. *Nutr. Rev.*, p. 197-208, 1983.

PRASAD, A.S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 403-12, 1991.

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

RAMAKRISHNAN, U.; MANJREKAR, R.; RIVERA, J.; GONZALES-COSSIO, T.; MARTORELL, R. Micronutrients and pregnancy outcome: a review of the literature. *Nutr. Res.*, v. 19, p. 103-59, 1999.

REDLINE, R.W., LU, C.Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leucocytes in murine placenta. *Lab. Invest.*, v. 61, p. 27-36, 1989.

REICHE, E.M.V.; INOUE, M.M.Z.; BONAMETTI, A.M.; JANKEVICIUS, J.V. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. *J. Pediatr.*, v. 72, p. 125-32, 1996.

RIVERA, M.Y.; De SOUZA, A.P.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; De CASTRO, S.L.; VANDERPAS, J. Trace elements innate immune response and parasites. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 41, p. 1020-5, 2003.

ROBINSON, L.K.; HURLEY, L.S. Effect of maternal zinc deficiency or food restriction on rat fetal pancreas. I. Procarboxypeptidase A and chymotrypsinogen. *J. Nutr.*, v. 111, p. 858-77, 1981.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M.C.G.; MINOPRIO, P.; HONTEYBERIE-JOSKOWICZ, M. The influence of T-cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Imm. Letters*, v. 49, p. 163-68, 1996.

SANDERSON, C.J.; THOMAS, J.A.; TWOMEY, C.E. The growth of *Trypanosoma cruzi* in human diploid cells for the production of trypomastigotes. *Parasitology*, v. 80, p. 153-62, 1980.

SARAIVA, J. Caracterização genética, morfométrica e avaliação da suscetibilidade a substância da cepa TA de *Trypanosoma cruzi* e suas sub-populações, obtidas por centrifugação diferencial. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2003.

SARASÚA, W.M. Detection de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Artigas – Uruguay. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 26, p. 28, 1993.

SARTORI, A.M.; LOPES, M.H.; BENVENUTI, L.A.; CARAMELLI, B.; DI PIETRO, A.; NUNES, E.V.; RAMIREZ, L.P.; SHIKANSI-YASUDA, M.A. Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59, p. 784-86, 1998.

SARTORI, A.M.; SOTTO, M.N.; BRAZ, L.M.A.; OLIVEIRA-JUNIOR, O.C. PATZINA, R.A.; BARONE, A.A.; SHIKANSI-YASUDA, M.A. Reactivation of Chagas' disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 93, p. 631-32, 1999.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.*, v. 72, p. 76-86, 1991.

SCHMATZ, D.M., B.; BOLTZ, R.C., MURRAY, P.K. *Trypanosoma cruzi*: separation of broad and slender trypomastigotes using a continuous hypaque gradient. *Parasitol.*, v.87, p. 219-227, 1983.

SCHROEDER, H.A.; NASON, A.P.; TRIPTON, I.H.; BALASSAR, J.J. Essential trace metals in man: zinc relation to environmental cadmium. *J. Chronic Dis.*, v. 20, p. 179-210, 1967.

SESHADRI, S. Prevalence of micronutrient deficiency particularly of iron, zinc and folic acid in pregnant women in South East Asia. *Br. J. Nutr.*, v. 85 (suppl), p. S87-92, 2001.

SEVE, M.; CHIMIANTI, F.; FAVIER, A. Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathol. Biol.*, v. 50, p. 212-21, 2002.

SHANKAR, A.H.; KUMAR, N.; SCOTT, A.L. Zinc-deficiency exacerbates experimental malaria infection in mice. *FASEB J.*, v. 9, p. A4269, 1995.

SHANKAR, A.H; PRASAD, A.S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68 (suppl.), p. 447S-63, 1998.

SHAW, J.C.L.; BURY, A.J.; BARBER, A.; MANN, L.; TAYLOR, A. A micromethod for the analysis of zinc in plasma or serum by atomic absorption spectrophotometry using graphite furnace. *Clin. Chim. Acta*, v. 118, p. 229-239, 1982.

SMITH Jr., J.C.; BUTRIMOVITZ, G.P.; PURDY, W.C. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chem.*, v. 25, p. 1487-91, 1979.

SMITH Jr., J.C.; HOLBROOK, J.T.; DANFORD, D.E. Analysis and evaluation of zinc and copper in human plasma and serum. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 4, p. 627-38, 1985.

SMITH Jr., J.C.; LEWIS, S.; HOLBROOK, J.T.; SEIDEL, K.; ROSE, A. The effect of anticoagulant on the plasma concentration of several indices of clinical relevance. *Clin. Chem.*, v. 33, p. 814-16, 1987.

SOARES, M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 78, p. 547-59, 2001.

SOLÉ, D.; NAPSPITZ, C.K. O zinco, a gestação e o conceito. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, vol. 41, p. 31-8, 1996.

SOLTAN, M.H.; JENKINS, D.M. Maternal and fetal plasma zinc concentration and fetal abnormality. *British J. Obstet. Gynaecol.*, v. 89, p. 56-8, 1982.

SOMMER, A.L.; LIPMAN, C.B. Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant. Physiol.*, v. 1, p. 231-49, 1926.

SOUTO R.P.; FERNANDES O.; MACEDO A.M.; CAMPBELL D.A.; ZINGALES B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 83, p. 141-52, 1996.

SOUTO R.P.; ZINGALES B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol., v. 62, p. 45-52, 1993.

SOWA, B.; STEIBERT, E. Effects of oral cadmium administration to female rats during pregnancy on zinc, copper, and iron content in placenta, foetal liver, kidney, intestine and brain. Arch.Toxicol. v. 56, p. 256-62,1985.

SPRENGER, K.B.G.; FRANZ, H.E. Viscosity adaption for an automated micromethod of flame atomic absorption spectrometry, and intracellular trace-element analysis after pressure decomposition: zinc determination in plasma and erythrocytes. Clin.Chem., v. 29, p. 1522-26, 1983.

TARLETON, R.L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? Parasitol. Today, v. 15, p. 94-8, 1999.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol., v. 31, p. 550-54, 2001.

TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity? Trends Parasitol., v. 19, p. 447-51, 2003.

TASCI, S.; SENGIL, A.Z.; ALTINDIS, M.; ARISOY, K. The effect of zinc supplementation in experimentally induced *Toxoplasma gondii* infection. J. Egypt. Soc. Parasitol., v. 25, p. 745-51, 1995.

TIBAYRENC M.; KJELLBERG F.; AYALA, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*,

Trichomonas, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 87, p. 2414-8, 1990.

TODD, W.R.; ELVEJHEIM, C.A; HART, E.B. Zinc in the nutrition of the rat. Am. J. Physiol., v. 107, p. 146-56, 1934.

TOMA, H.K.; CERÁVOLO, I.P.; GUERRA, H.L.; STEINDEL, M.; ROMANHA, A.J. *Trypanosoma cruzi*: parasitemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. Int. J. Parasitol., v. 30, p. 593-97, 2000.

TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology, v. 110, p. 547-54, 1995.

TRAVÉ, T.D.; FERREIRA, R.M.C.C.; ABULI, M.P.; MOREAL, I.; VILLA-ELIZAGA, I. Zinc concentration in Amniotic Fluid of Zinc-deficient rats and its relation to fetal weight. Biol.Neonate, v. 47, p. 230-34, 1985.

TUCKER, H.F., SALMON, W.D. Parakeratosis on zinc deficiency disease in the pig. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 88, p. 613-16, 1955.

TURAN, B.; HOTOMAROGLU, O.; DEMIREL-YILMAZ, E. Cardiac dysfunction induced by low and high diet antioxidant levels comprising selenium and vitamin E in rats. Reg. Toxicol. Pharmacol., v. 29, p. 142-50, 1999.

TUTTLE, S.; AGGETT, P.J.; CAMPBELL, D.; Mac GILLIVRAY, I. Zinc and copper nutrition in human pregnancy: a longitudinal study in normal primigravidae and in

primigravidae at risk of delivering a growth retarded baby. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 41, p. 1032-41, 1985.

VALLEE, B.L. The function of metallothionein. *Neurochem. Int.*, v. 27, p. 23-33, 1995.

VAN EECKHOUT, M.; VARANI, J.; PEKAREK, R.; KELLEHER, J. Effects of nutritional deficiency on *Herpes simplex* virus infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 30, p. 47-50, 1976.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 16 (suppl.), p. 12-17, 2000.

WASOWICZ, W.; WOLKANIN, P.; BEDNARSKI, M.; GROMADZINSKA, J.; SKŁODOWSKA, M.; GRZYBOWSKA, K. Plasma trace element (Se, Zn, Cu) concentrations in maternal and umbilical cord blood in Poland. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 8, p. 205-15, 1993.

WELLINGHAUSEN, N. Immunobiology of gestational zinc deficiency. *British J. Nutr.* v.85 (suppl.), p. S81-6, 2001.

WELLINGHAUSEN, N.; KIRCHNER, H.; RINK, L. The immunobiology of zinc. *Imm. Today*, v. 18, p. 519-21, 1997.

WHO. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. WHO Technical Report Series, v. 815, 1991.

WHO. Chagas Disease. World Health Organization. www.who.int/en/ , 2003.

WIRTH, J.J.; FRAKER, P.J.; KIERSZENBAUM, F. Zinc requirement for macrophage function: effect of zinc deficiency on uptake and killing of a protozoan parasite. *Immunology*, v. 68, p. 114-9, 1989.

WOODALL, S.M.; BREIER, B.H.; JOHNSTON, B.M.; GLUCKMAN, P.D. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: Effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *J. Endocrinol.*, v. 150, p. 231-42, 1996.

WOODING, F.B.P.; FLINT, A.P.F. Placentation. In: Lamming G.E. (Ed.). *Marshall's physiology of reproduction*. 4th ed. London: Chapman & Hall, p.233-460, 1994.

WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice. Multiple genes influencing parasite-mice and survival. *Infection and Immunity*, v.36, p. 637-44, 1982.

YAMAN, M.; ATICI, D.; BAKIRDERE, S.; AHDENIZ, I. Comparison of trace metal concentration in malign and benign human prostate. *J. Med. Chem.*, v. 48, p. 630-4, 2005.

YAZDANI, M.; FONTENOT, F.; GOTTSCHALK, S.B.; KANEMARU, Y., Jr.; F.J., NAKAMOTO, T. Relationship of prenatal caffeine exposure and zinc supplementation on fetal rat brain growth. *Dev. Pharmacol. Ther.*, v. 18, p. 108-15, 1992.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infec. Dis.*, v. 180, p. 480-86, 1999.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M.E.; ALMEIDA, K.A.; UMEZAWA, E.S.; NEHME, N.S.; OLIVEIRA, R.P.; MACEDO, A., SOUTO, R.P. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener-the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 92, p. 811-4, 1997.

ZINGALES, B. Revisiting *Trypanosoma cruzi*: the meaning of the two major groups, two species of the same parasite? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.95 (suppl.II), p. 10-2, 2000.
