

**Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL SOBRE O CURSO DA
INFECCÃO PELA CEPA Y DO *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À ALTERAÇÃO DOS ESTOQUES DE FERRO PELO USO DA
DEFERRIOXAMINA**

Amanda Fortes Francisco

Ouro Preto, MG
Dezembro de 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL SOBRE O CURSO DA
INFECÇÃO PELA CEPA Y DO *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À ALTERAÇÃO DOS ESTOQUES DE FERRO PELO USO DA
DEFERRIOXAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.
Orientadora: Prof^ª Dra. Cláudia Martins Carneiro.
Co-Orientadora: Prof^ª Dra. Maria Lúcia Pedrosa.

Ouro Preto, MG
Dezembro de 2007

Neste trabalho foi verificado o efeito do tratamento com o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento da Doença de Chagas em camundongos submetidos a alterações nos estoques de ferro. Utilizaram-se camundongos Swiss machos com trinta dias de idade, divididos em sete grupos experimentais: (1) não infectado não tratado - NINT; (2) infectado não tratado - INT; (3) tratado com Benzonidazol (Bz) - BZ; (4) infectado e tratado com Desferrioxamina (DFA) por 21 dias (DFA-21); (5) infectado e tratado com Bz e DFA por 21 dias (BZ/DFA-21); (6) infectado e tratado com DFA por 35 dias (DFA-35) e (7) infectado e tratado com BZ e DFA por 35 dias (BZ/DFA-35). Os animais dos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35 receberam 5mg/animal/dia de DFA durante os 14 dias que precederam à infecção (500 formas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* via intraperitoneal). Os animais tratados com Bz receberam o fármaco a partir do primeiro dia de infecção e por mais 21 dias. Após a infecção, o grupo DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35 receberam DFA por mais 21 dias. Foram avaliadas as curvas de parasitemia diariamente, período pré-patente, período patente, pico de parasitemia, dia do pico de parasitemia e taxa de mortalidade. Hemocultura, PCR e ELISA negativos foram utilizados como critérios para definir cura parasitológica. Os animais foram necropsiados no 10^o e 16^o dia pós infecção (dpi) sendo determinados os níveis de ferro hepático, sérico e de hemoglobina. Avaliou-se também o peso dos animais, o peso relativo e o parasitismo do coração, fígado, baço e linfonodo. O processo inflamatório foi avaliado no coração e fígado. No grupo BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35, a média dos níveis de parasitemia, a taxa de mortalidade apresentaram-se menores em relação ao grupo INT. Não foram observadas diferenças significativas no período pré-patente. Cinquenta e dois animais dos grupos BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35 sobreviveram à infecção e 52% apresentaram hemocultura negativa, 40% PCR negativa e 6% ELISA negativa aos 240 dpi. Todos os animais infectados apresentaram menores níveis de ferro hepático que os animais do grupo NINT no 10^o e 16^o dia. Os animais dos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35 apresentaram em média maiores concentrações de ferro sérico quando comparados aos demais grupos no 10^o e 16^o dia. Aos 14 dpi os animais do grupo BZ/DFA-35 apresentaram em média níveis mais altos de hemoglobina quando comparados aos demais grupos ao contrário do grupo DFA-35 onde os níveis de hemoglobina diminuíram. O tratamento com a DFA aumentou o peso corporal dos animais dos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35. Entre o 10^o e 16^o dia observou-se aumento de peso relativo do coração, baço, fígado e linfonodo apenas nos grupos que foram tratados com a DFA associada ou não ao Bz. Os animais do grupo DFA-35 apresentaram maior processo inflamatório cardíaco e hepático em relação aos demais grupos. Não foram encontrados parasitos nos tecidos dos animais tratados com Bz e no linfonodo de todos os grupos avaliados. Verificou-se redução do parasitismo cardíaco nos animais tratados com a DFA (21 e 35) em relação ao grupo INT. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao parasitismo hepático e esplênico nos grupos INT, DFA-21 e 35. De modo geral, pode-se dizer que o tratamento com Bz realizado em camundongos que apresentam redução dos estoques de ferro tem um curso distinto do observado em camundongos não submetidos à terapia de quelação.

In this work we verified the effect of the treatment with the only drug employed in Brazil for the treatment of Chagas' disease in mice submitted to alterations in the iron supplies. Male Swiss mice with thirty days of age were divided in seven experimental groups: (1) not infected and not treated - NINT; (2) infected and not treated - INT; (3) treated with Benznidazole (Bz) - BZ; (4) infected and treated with Desferrioxamine (DFA) during 21 days (DFA-21); (5) infected and treated with Bz and DFA during 21 days (BZ/DFA-21); (6) infected and treated with DFA during 35 days (DFA-35) and (7) infected and treated with Bz and DFA during 35 days (BZ/DFA-35). Animals of DFA-35 and BZ/DFA-35 groups received 5mg/day of DFA during 14 days that had preceded the infection (500 blood forms of Y strain of the *T. cruzi* via intraperitoneal). The animals treated with Bz received the drug from the first day of the infection and during 21 days more. After the infection, the DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 and BZ/DFA-35 groups received DFA during 21 days more. In the infected groups, treated or not, parasitemia, prepatent period, patent period, peak of parasitemia, day of maximum parasitemia and mortality were daily evaluated. Hemoculture, ELISA and PCR were used as parasitological cure criterion. In all groups, iron levels in liver, hemoglobin and iron serum were determined. One also evaluated the weight of the animals, the relative weight and tissue parasitism of the heart, liver, spleen and lymphonodes. The animals were sacrificed in 10th and 16th days after the infection (dpi). The BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 and BZ/DFA-35 groups presented lesser average levels of parasitemia and mortality than the INT group. Differences in the prepatent period were not observed. Fifty two animals of BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 and BZ/DFA-35 groups survived the infection. Among animals treated that survived to the acute phase of the infection, 52% presented negative hemoculture, 40% negative PCR and 6% of the animals presented negative ELISA in the acute phase. Infected animals presented minors levels of iron in the liver than the NINT group in 10th and 16th day. The animals of DFA-35 and BZ/DFA-35 groups presented, in average, higher concentrations of iron serum than the remaining groups in the 10th and 16th day. Animals of BZ/DFA-35 group presented 14 dpi higher levels of hemoglobin than the other groups; on the contrary, the DFA-35 group presented minors levels of hemoglobin. The treatment with DFA increases corporal weight in DFA-35 and BZ/DFA-35 groups. Between 10th and 16th day increase of relative weight of the heart, spleen, liver and lymphonodes were observed in groups treated with DFA associated or not to Bz. The animals of DFA-35 group presented, in average, more inflammation in the heart and liver than the others groups. There were no parasitic in the animals treated with Bz. It was verified a heart tissue parasitism reduction in the treated animals with the DFA in comparison to the INT group. Significant differences in relation to the hepatic and esplenic parasitism in INT, DFA-21 and 35 groups were not observed. In a general way, one could say that mice submitted to the treatment with Bz that present reduction in the iron store, have a distinct course than the one observed in mice not submitted to the quelation therapy.

Ao meu pai e avô materno por terem me dado as melhores recordações da minha vida.

“Por muito tempo achei que ausência é falta. E lastimava, ignorante a falta. Hoje não a lastimo. Não há falta na ausência. A ausência é um estar em mim. E sinto-a, branca, tão pegada, aconchegada em meus braços, que rio e danço e invento exclamações alegres, porque a ausência, essa assimilada, ninguém a rouba mais de mim”.

Carlos Drummond de Andrade

À professora Cláudia, pela oportunidade, aceitação, orientação, apoio e lições de saber. Obrigada por me ter transmitido os seus conhecimentos que me ajudaram na minha formação. Fica aqui minha gratidão a uma profissional que consegue mesclar a arte de ensinar com o dom da convivência, e não se limita em ser apenas mais uma orientadora. Você é alguém em quem confio e que tem todo o meu afeto e a minha amizade.

À Jerusa, pela oportunidade, apoio e ensinamentos. Obrigada por ter me ensinado grande parte das técnicas utilizadas neste trabalho. Obrigada pela presença nos bons e maus momentos e pela amizade, sempre. Muita gente entra e sai na nossa vida ao longo dos anos. Mas só os verdadeiros amigos deixam impressões em nosso coração.

À Paula, pela ajuda incansável durante todos os experimentos e pela companhia tão agradável. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e pela cumplicidade em todas as etapas de nossa formação. Quando uma amizade é verdadeira não há fim, há sempre um recomeço, não importa de qual forma.

À Maria Chaves, pelos ensinamentos das técnicas histopatológicas, pela paciência no começo do meu processo de aprendizagem e pelo carinho.

Ao professor Washington Tafuri, pelo carinho e apoio a continuidade deste projeto.

À Lucinha, pela co-orientação enriquecedora e pela disponibilidade sempre que precisei.

À Juliana e a Nádia, pela incrível companhia, apoio e amizade ao longo do curso. Mesmo que o tempo e a distância digam não nunca me esquecerei de vocês.

Aos queridos amigos do laboratório de Imunopatologia Kátia, Carol, Ana, Raquel, Rafael, Bruno, Henrique, Rodrigo, Sheler, Samuel, Levi, Wendel e Rodolfo que me ajudaram em alguns momentos no desenvolvimento deste trabalho. Pela agradável convivência e carinho.

À Helen, que me ajudou na execução de parte deste trabalho. Obrigada pela seriedade e disponibilidade, sempre que precisei.

A todos que participaram de alguma forma na execução deste trabalho, em especial ao Maykon e a Maísa, pela ajuda.

Ao professor Alexandre pelo incentivo constante e pelas sugestões.

Ao professor Wanderson pela disponibilidade sempre.

À Terezinha pelo inóculo dos animais.

A todos os funcionários do Biotério da UFOP, em especial á Cristina, pela disponibilidade e auxílio, sempre.

À Cida, secretária do NUPEB, pela simpatia e disponibilidade sempre que precisei.

À minha mãe, avó e bisavó maternas pelo carinho, sempre. Mãe, obrigada por compartilhar meus ideais e os alimentarem, incentivando-me a prosseguir, mostrando-me que o caminho deve ser seguido sem medo, independente dos obstáculos. A você, mãe, não mais que com justiça, dedico esta vitória.

Ao meu querido e amado irmão, pelo incentivo e carinho. Obrigada por me apoiar em todas as minhas escolhas, saiba que sua presença em minha vida é fundamental.

Ao Flávio, pelo apoio, incentivo e paciência. A maior felicidade é a certeza de sermos amados apesar de ser como somos.

Bz - Benzonidazol

BZ - grupo infectado e tratado com benzonidazol

BZ/DFA-21 - grupo infectado e tratado com BZ e DFA

BZ/DFA-35 - grupo infectado e tratado com BZ

DC - doença de Chagas

DFA - Desferrioxamina

DFA-21 - grupo infectado e tratado com desferrioxamina por 21 dias

DFA-35 - grupo infectado e tratado com DFA durante 35 dias

DPI - dias pós-infecção

DPMP - dia do pico máximo de parasitemia

HE - hematoxilina & eosina

IMH - imuno-histoquímica

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

INT - grupo infectado e não tratado

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

NINT - grupo não infectado e não tratado

NO - óxido nítrico

PCR - reação em cadeia de polimerase

PMP - pico máximo de parasitemia

PPP - período pré-patente

PP - período patente

ROS - espécies reativas de oxigênio

TfR1 - receptor de transferrina 1

TfR2 - receptor de transferrina 2

1 - Introdução	2
2.1 - Objetivo geral	19
2.2 - Objetivos específicos.....	19
3 - Animais, materiais e métodos	20
3.1 - Animais e tratamentos utilizados.....	21
3.2 - Infecção e parâmetros biológicos avaliados.....	23
3.2.1 - Curva de parasitemia	23
3.2.2 - Taxa de mortalidade.....	24
3.2.3 - Hemocultura	24
3.2.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)	24
3.2.5 - Pesquisa de anticorpos anti- <i>T.cruzi</i> pela (ELISA)	25
3.3 - Parâmetros relacionados à avaliação do ferro	26
3.3.1 - Ferro tecidual	26
3.3.2 - Ferro sérico	26
3.3.3 - Níveis de hemoglobina.....	27
3.4 - Necrópsias, coleta, fixação e processamento do material.....	28
3.5 - Técnica de Imuno-histoquímica para identificação do <i>T. cruzi</i>	28
3.6 - Quantificação do parasitismo tecidual	29
3.7 - Quantificação da inflamação no coração e fígado.....	30
3.8 - Análise estatística	30
4 - Resultados	31
4.1 - Curva de parasitemia	32
4.2 - Taxa de mortalidade.....	34
4.3 - Hemocultura	35
4.4 - PCR.....	35
4.5 - ELISA	35
4.6 - Ferro tecidual	36
4.7 - Dosagem de ferro sérico	37
4.8 - Níveis de hemoglobina	39
4.9 - Peso dos animais	40
4.10 - Peso relativo dos órgãos.....	42
4.11 - Análise morfométrica do processo inflamatório no coração e fígado	44
4.12 - Análise morfométrica do parasitismo tecidual	46
5 - Discussão.....	51
6 - Conclusões.....	64
7 - Perspectivas futuras	66
8 - Referências bibliográficas	68

Gráfico 1 - Curvas das médias de parasitemia de camundongos Swiss inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Gráfico 2 - Taxa de mortalidade cumulativa de camundongos Swiss inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Gráfico 3 - Média da quantidade de ferro hepático no 10 ^o e 16 ^o dia nos camundongos Swiss infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Gráfico 4 - Média da dosagem de ferro sérico realizada no 10 ^o e 16 ^o dia nos camundongos Swiss infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
Gráfico 5 - Média da dosagem de hemoglobina realizada no 14 ^o dia nos camundongos Swiss infectados com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Gráfico 6 - Média do peso corporal dos camundongos Swiss infectados com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> antes da infecção e aos 7, 14 e 21 dias pós-infecção.....	41
Gráfico 7 - Peso relativo do coração, fígado, baço e linfonodo dos animais no 10 ^o e 16 ^o dia infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Gráfico 8 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco (A e B) e hepático (C e D) no 10 ^o e 16 ^o dia de camundongos Swiss infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Gráfico 9 - Análise morfométrica do parasitismo tecidual no coração, fígado e baço de camundongos Swiss infectados com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	47

- Figura 1 - Delineamento experimental. Camundongos Swiss machos infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*..... 22
- Figura 2 - Fotomicrografias de secções do coração e fígado de camundongos pertencentes aos grupos não infectado, infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* tratado com Desferrioxamina por 35 dias.48
- Figura 3 - Fotomicrografias de secções do coração, fígado e baço submetidas às reações imuno-histoquímicas para detecção do parasito. |49

Tabela 1 - Cinética da parasitemia de camundongos Swiss inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos.....33

Tabela 2 - Resultados de hemocultura, PCR e ELISA nos camundongos que sobreviveram à fase aguda da infecção pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.....35

1.1 - *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e é transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae durante seu repasto sanguíneo (Chagas, 1909). Esta doença é amplamente dispersa no continente americano. Entretanto, após a implantação de medidas de controle na transmissão vetorial e transfusional ocorreu um decréscimo substancial na incidência da DC na América Latina (Moncayo, 2006). Porém, estima-se que 13 milhões de indivíduos nas Américas Central e do Sul ainda encontram-se infectados por esse parasito e aproximadamente 25% da população da América Latina correm risco de adquirir a doença (WHO, 2005).

O *T. cruzi* é capaz de parasitar diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, células musculares lisas e estriadas além de fibroblastos (Andrade e Andrews, 2005). Entretanto, algumas populações desse parasito apresentam tropismo preferencial para células fagocitárias do baço, fígado e medula óssea sendo denominadas de macrofagotrópicas (cepa Y), ou para células musculares lisa, esquelética e cardíaca sendo denominadas de miótrópicas (cepa Be-78). Outros tipos de tropismo têm sido descritos, como por exemplo o neurotropismo (cepa PNM) (Bice e Zeledon, 1970; Andrade, 1974).

A infecção pelo *T. cruzi* é caracterizada por duas fases distintas, uma de curta duração denominada de fase aguda, seguida por uma fase de longa duração que persiste por toda a vida do indivíduo na ausência de tratamento específico. A fase aguda, que pode durar de 30 a 90 dias é caracterizada por elevado parasitismo tecidual e parasitemia patente (Prata, 2001). A parasitemia tende a diminuir após o início da elaboração da resposta imune específica contra antígenos do parasito, sendo este um importante parâmetro para o estudo desta doença (Giordanengo *et al.*, 2002). Esta fase é caracterizada pela escassez de sinais e sintomas clínicos passando despercebida na maioria dos pacientes, sendo que em alguns casos podem ser observados sinais e sintomas inespecíficos tais como febre, taquicardia, linfadenopatia, esplenomegalia e edema (Prata, 2001). Pacientes imunossuprimidos e crianças podem desenvolver uma fase aguda mais grave, com envolvimento cardíaco e encefalomielite levando à morte (Zhang e Tarleton, 1999).

Na fase crônica, a maioria dos indivíduos permanece assintomático caracterizando a forma indeterminada ou inaparente da doença (Tanowitz *et al.*, 1992;

Prata, 2001). Nesta fase, o indivíduo apresenta ausência de sinais e sintomas, exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdome normais e parasitemia baixa ou ausente. Entretanto, a suspeita da infecção pode ser confirmada por testes sorológicos (ELISA, IFI, HAI) ou evidenciada por testes parasitológicos (hemocultura, xenodiagnóstico e PCR) como demonstrado por Chiari *et al.*, (1989), Barreto e Lanni, (1994) e Gomes *et al.*, (1998). A forma indeterminada é a mais freqüente ocorrendo em 70% dos indivíduos (Tanowitz *et al.*, 1992; Prata, 2001). Contudo, cerca de 30% desenvolvem a fase crônica sintomática em um período variável de 10 a 30 anos após a infecção (Amato Neto, 1986; Dias, 1989; Brener e Gazzinelli, 1997; Moncayo, 1999), caracterizando as formas clínicas cardíaca e digestiva, esta última compreendendo o megacólon e/ou megaesôfago. A ocorrência de manifestações cardíacas e digestivas caracteriza a forma mista da doença (Tanowitz *et al.*, 1992; Prata, 2001). As razões pelas quais a DC se manifesta de forma distinta ainda permanecem desconhecidas e diferenças regionais na distribuição dessas formas clínicas também têm sido registradas (Coura *et al.*, 1983; de Rezende e Moreira, 1988).

Diferentes cepas do *T. cruzi* têm sido utilizadas em estudos das fases aguda e crônica da infecção, o que é de extrema relevância, pois como apresentam comportamentos biológicos distintos (Andrade e Magalhães, 1996), espera-se que os resultados dessa interação parasito/hospedeiro possam gerar quadros clínicos com características e conseqüências bastante variadas. Análises moleculares de diferentes isolados do *T. cruzi* têm demonstrado que as populações do parasito são extremamente polimórficas (Buscaglia e Di Noia, 2003). Contudo, a presença de populações distintas vem sendo correlacionada às alterações observadas em diferentes formas clínicas da doença (Vago *et al.*, 2000), sugerindo que populações distintas geneticamente apresentam tropismo tecidual característico, que pode influenciar no resultado da infecção (Macedo *et al.*, 2004).

A cepa Y do *T. cruzi* foi isolada por Pereira de Freitas em 1950 e foi estudada por Silva e Nussenzweig em 1953. Essa cepa, por apresentar algumas particularidades como a predominância de formas tripomastigotas sangüíneas delgadas altas virulência e patogenicidade para camundongos, assim como um determinado grau de resistência a quimioterápicos a tornaram uma cepa de referência, sendo provavelmente uma das mais citadas na literatura. Esses parasitos possuem um ciclo de vida constante e estável em animais de laboratório e os padrões hematológicos e histopatológicos

causado por essa cepa nesses animais são bastante reprodutíveis, tornando-os ideais para estudos experimentais (Pinto *et al.*, 1999).

Entretanto, o aumento ou a perda da infectividade e da virulência de diversas cepas do *T. cruzi* após longo período de manutenção em camundongos ou cultura acelular já foram sugeridos por alguns autores, contudo, outros parâmetros se mantêm estáveis (Pizzi e Prager, 1952; Chiari, 1974; Brener *et al.* 1976).

1.2 - Resposta imune na doença de Chagas

A resposta imune do hospedeiro apresenta importante papel no controle da infecção pelo *T. cruzi*, pois através de seus mecanismos de ação, o parasito é continuamente combatido, diminuindo dessa maneira sua multiplicação nos tecidos. Grande parte das manifestações clínicas da DC deve-se à ativação da resposta imune dirigida contra o parasito (Aliberti *et al.*, 1996). A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas por outro lado, eventualmente contribui para o aparecimento das manifestações clínicas crônicas devido às respostas auto-ímunes (Leon e Engman, 2001). Apesar de todas as tentativas do sistema imune, o parasito pode persistir indefinidamente no hospedeiro, assim como a atividade imunológica com conseqüente lesão tecidual e alterações histológicas e funcionais, características da doença (Tarleton, 2001). Estudos recentes indicam a prevalência da resposta tipo 1 no início da infecção, seguida pela tipo 2 na fase tardia (Zhang e Tarleton, 1999).

Estudos experimentais em roedores infectados com várias cepas do *T. cruzi* têm sido um instrumento na determinação do papel de várias citocinas e tipos celulares em mediar proteção contra a infecção aguda (Dutra *et al.*, 2005). Em camundongos, durante a fase inicial da infecção, macrófagos podem responder às formas tripomastigotas de maneira dependente de receptores Toll-like (Myd88) e produzir citocinas como IL-12 e TNF- α que facilitam a polarização de células T CD4⁺ e CD8⁺ em resposta ao IFN- γ (Campos e Gazzinelli, 2004). O IFN- γ é essencial para o controle da infecção e é produzido pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ (Brener e Gazzinelli, 1997; Martin e Tarleton, 2004). Isto ocorre porque o *T. cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, que induz a produção de IL-12, que além de estimular a proliferação de linfócitos T, ativa as células NK (Natural Killer) a produzirem IFN- γ , cuja função é acionar os macrófagos para a atividade microbicida (Aliberti *et al.*, 1996). A resposta

imune inata é muito importante na resistência do hospedeiro contra a invasão por protozoários. As células NK são importantes por limitarem o crescimento parasitário e por iniciarem o desenvolvimento da resposta imune adquirida (Scott e Trinchieri, 1995).

Macrófagos ativados por TNF- α e IFN- γ parecem ter um importante papel em controlar o crescimento do parasito. Dessa forma o TNF- α , produzido pelos macrófagos durante a infecção, interage de forma sinérgica tanto com a IL-12 como com IFN- γ , induzindo os macrófagos a expressarem a enzima óxido-nítrico sintase induzida (iNOs) a produzirem NO (óxido nítrico) (Miller *et al.*, 2002). O NO parece ser importante no controle da multiplicação do parasito como verificado por Silva *et al.* (2003), mas há evidências de que outros mecanismos independentes dessa via também participam desse controle (Cummigs e Tarleton, 2004). No modelo murino a resistência à infecção têm sido associada à produção de NO, estimulada pelo aumento da produção de IFN- γ (Plata *et al.*, 1984; Reed, 1988; Vespa *et al.*, 1994).

Além dos macrófagos, existe um papel claro das células T CD8⁺ (Martin e Tarleton, 2004) e de anticorpos (Umekita e Mota, 2000) no controle da infecção aguda. Várias citocinas, especialmente IL-4 e IL-10, possuem um importante papel no controle da resposta imune tipo 1 (Soares *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002). Estas citocinas podem interferir na habilidade do hospedeiro em lidar com a infecção, mas elas também podem prevenir uma inflamação tecidual excessiva indesejada. Está claro que o controle efetivo da infecção requer a interação e ativação das células umas com as outras em microambientes apropriados (Dutra *et al.*, 2005).

Borges *et al.* (1992) descreveram que a ativação dos macrófagos peritoniais, avaliada pela capacidade destas células liberarem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), varia de acordo com o hospedeiro e a cepa do parasito. A capacidade dos macrófagos participarem da destruição de certos parasitos envolve vários mecanismos complexos que dependem também da cepa do parasito (Milder *et al.*, 1977; Alcantara e Brener, 1978), da forma evolutiva (Milder *et al.*, 1977; Nogueira *et al.*, 1980; Kloetzel *et al.*, 1984), além do estado de ativação dos macrófagos (Nogueira *et al.*, 1977).

A imunidade celular também tem importante papel na defesa contra o *T. cruzi*. O controle da fase aguda da infecção está relacionado com a resposta celular, onde as células T exercem um efeito anti-parasito precoce e anterior à produção de anticorpos (Trischmann, 1978). Como as células T compreendem a maioria das células presentes no infiltrato inflamatório do miocárdio de pacientes com a forma cardíaca da doença (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997) e são hábeis em reagir ao parasito (Mosca *et al.*,

1985; Morato *et al.*, 1986) e antígenos do hospedeiro (Gazzinelli *et al.*, 1990; Dutra *et al.*, 2000), provavelmente são as principais “orquestrantes” da reatividade imune na DC (Dutra *et al.*, 2005).

Animais duplamente deficientes destas células são ainda mais susceptíveis à infecção (Tarleton *et al.*, 1996). O papel das células T CD4⁺ pode ser demonstrado pela sua capacidade em auxiliar a produção de anticorpos e citocinas como o IFN- γ (Brener, 1986; Tarleton *et al.*, 1996). A importância das células T CD8⁺ pode ser explicada pelo fato de que o *T. cruzi* pode infectar qualquer tipo de célula. As células não-linfóides infectadas expressam apenas MHC de classe I, que não são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺, mas poderiam ser identificadas por células T CD8⁺ efectoras (Lenzi *et al.*, 1996). Estudos *in vitro* indicam que células infectadas com o *T. cruzi* são reconhecidas por linfócitos T CD8⁺ obtidos de animais infectados com o mesmo parasito (Nickell *et al.*, 1993). Animais deficientes no gene β 2-microglobulina (que se associa com os produtos do *loci* do MHC de classe I e esta combinação funciona no desenvolvimento do timo e na apresentação de antígenos às células T CD8⁺), não expressam moléculas de classe I, perdem linfócitos T CD8⁺ e são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 1992). Indivíduos portadores das formas indeterminada ou cardíaca da doença apresentam aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes não possuindo a molécula de superfície CD28⁺. Considerando a importância de CD28⁺ para ativação de células T, a observação da baixa regulação ou perda de CD28⁺ durante a infecção pode indicar uma possível base para eventos imunoregulatórios ou estágios distintos de ativação de células T na infecção pelo *T. cruzi* (Dutra *et al.*, 1996).

Evidências da ocorrência de imunidade humoral estão representadas pela presença de anticorpos atuando na defesa contra o parasito em diversos estudos experimentais e humanos. Foi observado que em infecções agudas, no modelo murino, ocorre ativação policlonal intensa de linfócitos B, com hiperprodução de imunoglobulinas (Minoprio *et al.*, 1989). Contudo, a distribuição de isotipos permanece invariável ao longo do curso da infecção e é caracterizada pela predominância de IgG2a e IgG2b (D’Império *et al.*, 1986).

A persistência do parasito e/ou a auto-imunidade no indivíduo infectado contribuem para o desenvolvimento da doença e patogenicidade (Soares, Pontes-de-Carvalho e Ribeiro-dos-Santos, 2001). A imunossupressão e a auto-imunidade presentes durante a infecção pelo *T. cruzi*, podem ser explicadas pela ativação

policlonal das células B, que afeta mecanismos regulatórios normais imunes (Minoprio, 2001). Antígenos persistentes do *T. cruzi* podem se tornar focos para as células T específicas mediando o processo de hipersensibilidade tardia (DTH), que conduz a lesões nos tecidos dos hospedeiros (Ben Younes-Chennoufi *et al.*, 1998; Tarleton e Zhang, 1999; Tarleton, 2001).

A DC pode ser avaliada, experimentalmente, através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais como ratos, camundongos, roedores silvestres, cães, coelhos, primatas e cobaias, podendo-se reproduzir nos mesmos, alguns aspectos patológicos da doença humana. O modelo murino tem sido escolhido por diversos pesquisadores em seus experimentos pela facilidade de obtenção, manutenção e pequeno porte. Os camundongos têm também sido utilizados no estudo de diversos parâmetros relacionados à interação parasito-hospedeiro, como por exemplo, no comportamento biológico de cepas do *T. cruzi*, na eficácia de várias drogas utilizadas na terapia específica contra o parasito e na resposta imunológica e histopatológica do hospedeiro (Brener *et al.*, 1976; Andrade *et al.*, 1985; Ben Yoenès-Chennoufi *et al.*, 1988; Rottenberg *et al.*, 1988).

Em camundongos, a DC se desenvolve de forma diferente da observada em humanos. Nestes animais, a fase aguda da infecção é caracterizada por alta parasitemia, grande disseminação do parasito e imunossupressão, levando-os com frequência à morte (Minoprio *et al.*, 1989).

O acometimento cardíaco é a principal causa de morbidade e mortalidade na DC, com níveis diferentes de danos ao sistema de condução e com a ocorrência de falha cardíaca em muitos casos graves (Prata, 2001). Diversos estudos confirmaram que durante o curso da infecção cardíaca, ocorrem alterações microvasculares induzidas pelo parasito que podem conduzir a degeneração miocárdica e inflamação crônica (Factor *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1990; Petkova *et al.*, 2001).

Os camundongos sobreviventes a um longo período de infecção pelo *T. cruzi* podem desenvolver miocardite intensa e lesões na inervação autonômica do coração (Tafari, 1970; Machado *et al.*, 1975), na microcirculação (Factor *et al.*, 1985) e mudanças eletrocardiográficas, parecidas com as encontradas na miocardite chagásica humana (Laguens *et al.*, 1981a). A inflamação do miocárdio é de extrema importância em todo o processo patológico da DC, devido à maneira como as reações ao *T. cruzi* se desenvolvem no coração. O acometimento do miocárdio em camundongos cronicamente infectados parece ser consequência do parasitismo e da inflamação

durante os primeiros estágios da doença (Schlemper *et al.*, 1983). A miocardite pode ser induzida experimentalmente através de injeções múltiplas de antígenos subcelulares específicos do *T. cruzi* (Teixeira *et al.*, 1975) ou através da transferência de células do baço de animais imunizados pelo *T. cruzi* para animais normais (Laguens *et al.*, 1981b, Gironès e Fresno, 2003) sugerindo a participação do sistema imune na patogênese da miocardite crônica.

O envolvimento cardíaco é caracterizado por degeneração e perda de miócitos, parasitismo tecidual, hipertrofia e hiperplasia do miocárdio (Higuchi *et al.*, 1987; Arnaiz, Fichera e Postan, 2002), infiltrados inflamatórios difusos ou locais, miocitólise, mionecrose e uma progressiva deposição de tecido fibroso (Garcia *et al.*, 2005). Contudo, os mecanismos responsáveis nas alterações teciduais permanecem desconhecidos (García *et al.*, 2006).

1.3 - Tratamento etiológico da doença de Chagas

O tratamento da DC ainda não apresenta resultados satisfatórios e tem sido alvo de muitas pesquisas na busca de novas drogas que sejam eficazes no combate ao *T. cruzi*.

O Benzonidazol (Bz) é um fármaco nitroheterocíclico (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) produzido pelo Laboratório Roche desde 1978, comercializado sob o nome de Rochagan® e atualmente é o único fármaco empregado no tratamento humano da DC no Brasil, sendo utilizado sob restrita supervisão médica, já que é usado por longo período e provoca efeitos colaterais relativamente graves como: reações cutâneas, às vezes acompanhadas de febre e púrpura, distúrbios gastrintestinais, principalmente náuseas, além de parestesias ou sintomas de polineurites periféricas, sobretudo após tratamento prolongado. Portanto, o fármaco ideal para o tratamento etiológico da DC ainda não existe (Pupulin *et al.*, 2005).

O Bz é um antiparasitário com atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*. A absorção por via digestiva é rápida e praticamente total. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 horas. O tempo de meia-vida de eliminação plasmática é de 12 horas aproximadamente em humanos.

O Bz reduz a duração e a gravidade clínica da fase aguda e congênita da infecção pelo *T. cruzi*. Este composto atinge 60% de cura em média (revisão de Coura e de Castro, 2002). Além disso, esta droga exibe baixa eficácia durante a fase crônica

da doença (Murta *et al.*, 1999) fazendo com que o desenvolvimento de novos fármacos mais seguros e eficazes seja prioritário.

É possível que o efeito tripanomicida do Bz não dependa da produção de radicais livres e nem da redução do grupo nitro. Este fármaco inibe a respiração do *T. cruzi* e não leva a produção de radicais livres em concentrações capazes de inibir o crescimento do parasito (Do Campo e Moreno, 1983). Por outro lado, o Bz afeta a síntese de proteínas e RNA em formas de cultura do *T. cruzi* (Polak e Richele, 1978).

O modelo murino tem sido utilizado para a avaliação da eficácia terapêutica de diferentes fármacos na infecção pelo *T. cruzi*. Em uma ampla revisão da literatura Toledo *et al.* (2004) demonstraram que das 104 cepas do parasito estudadas até o momento 58,5% foram susceptíveis aos derivados nitroheterocíclicos, 5,77% parcialmente sensíveis e 35,8% foram resistentes aos derivados nitroheterocíclicos. Embora a existência de cepas naturalmente resistentes aos derivados nitroheterocíclicos seja um fator importante influenciando a resposta ao tratamento (Filardi e Brener, 1987, Guedes *et al.*, 2002), alguns trabalhos verificaram que a manutenção do parasito no hospedeiro vertebrado por longo período promove aumento na resistência ao Bz (Toledo *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2001).

A eficácia ao tratamento parece apresentar associação com a resposta imune. Alguns trabalhos corroboram com essa observação, uma vez que demonstraram que o tratamento com derivados nitroheterocíclicos é menos efetivo em camundongos imunodeficientes que em animais imunocompetentes infectados pelo *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 1997). Nesse contexto, Lages-Silva *et al.* (1990) sugerem que a ativação do sistema imune pela IL-12 pode aumentar a eficácia do tratamento com Bz durante a DC experimental. Assim, a eficácia dos derivados nitroheterocíclicos durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, pode ser em parte explicada pela ativação precoce do sistema imune.

É muito bem documentado que o tratamento com derivados nitroheterocíclicos é mais efetivo durante a fase aguda da DC, quando uma forte ativação do compartimento celular do sistema imune libera altos níveis de IFN- γ e IL-12 e outras citocinas pró-inflamatórias. De acordo com estudos prévios usando a cepa Y do *T. cruzi*, a fagocitose *in vitro* por macrófagos murinos aumenta significativamente quando populações ou clones WT de *T. cruzi* são obtidos de camundongos infectados 3h após tratamento com Bz. O tratamento *in vivo* com Bz induz mudança na mobilidade e forma do parasito o que leva a um aumento na ativação do macrófago. O aumento de NO e citocinas tem

efeito direto no aumento da fagocitose de parasitos WT obtidos após tratamento *in vivo* com Bz (Murta *et al.*, 1999).

A combinação do tratamento com Bz aliado à resposta imune pode eliminar o parasito dos tecidos do hospedeiro. É possível que algumas cepas possam estimular a resposta imune de forma mais eficiente que outras. Cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes (Colombiana e VL-10) falham em induzir a síntese de IL-12 por macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Murta *et al.*, 1999).

De acordo com Michailowsky *et al.* (1998), a terapia com IL-12 pode aumentar os efeitos parasiticidas do Bz através da indução de IFN- γ por células NK e linfócitos T, culminando na ativação do macrófago. A habilidade de diferentes cepas de *T. cruzi* em evadir de uma indução recente de IL-12 e IFN- γ pode ser uma importante característica de parasitos com alta virulência que podem ser responsáveis ao menos em parte pela resistência do parasito a agentes quimioterapêuticos durante a fase aguda da DC.

Um grande obstáculo para obtenção da cura parasitológica é a grande variabilidade genética das populações de parasitos (Brenner e Chiari, 1967) e a existência de cepas naturalmente resistentes às drogas (Filardi e Brenner, 1987), o que pode estar relacionado à origem geográfica das mesmas (Murta *et al.*, 1999).

O Bz é o único fármaco com ação tripanomicida empregado, atualmente, no Brasil e apresenta eficácia limitada (Cançado, 2002). Portanto, a DC representa um importante problema social gerado, principalmente, pelo medo da morte súbita, pela falta de um medicamento que seja eficaz nas duas fases da doença ou ainda em consequência do afastamento das funções profissionais devido a uma série de debilitações e restrições impostas pela doença (Uchôa *et al.*, 2002).

1.4 - *Trypanosoma cruzi* e status de ferro

Entre os diversos fatores que influenciam o desenvolvimento da infecção por patógenos podem ser citados os nutricionais. O ferro, dentre todos os micronutrientes, é o metal pesado mais abundantemente encontrado nos tecidos e fluidos corporais (Crichton e Ward, 1992). Essencial para a sobrevivência de praticamente todas as células vivas é requerido para o crescimento e proliferação das mesmas. Possui papel importante no transporte de elétrons, síntese de DNA e várias reações redox essenciais (Letendre, 1985).

Muitos estudos têm demonstrado que o excesso de ferro no organismo pode se tornar tóxico pela indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como O_2^- e OH. O fígado é o principal órgão de estocagem de ferro durante a ocorrência de doenças de acúmulo de ferro como a hemocromatose genética e o excesso de ferro neste órgão contribui para o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (Niederau *et al.*, 1985, Griffiths *et al.*, 1999). Apesar da função do ferro no coração ainda não ser totalmente conhecida, sua homeostase é importante para a sua funcionalidade normal (Lesnefsky, 1994; McCord, 1996). Sabe-se que o ferro cataliza a formação de radicais livres via reações de Fenton, onde pode causar danos nos compostos de todas as classes bioquímicas incluindo membranas lipídicas, proteínas e DNA (Lesnefsky, 1994; McCord, 1996).

A deficiência de ferro prejudica a função de vários compostos que estão ligados a ele. Há redução da atividade da ribonucleotídeo redutase, requerida para a síntese de DNA (Bergeron, 1986), diminuição da atividade das desidrogenases contendo ferro-enzofre, do ciclo do ácido cítrico (Davies *et al.*, 1982) e diminuição da concentração de mioglobina e hemoglobina (Siimes *et al.*, 1980).

A manutenção da homeostase celular de ferro não é somente um requerimento geral para o crescimento e proliferação de todas as células, mas é também de extrema importância para a regulação do sistema imune. A sua deficiência predispõe o hospedeiro a infecções por interferir tanto na resposta celular quanto na humoral (Weinberg, 1984; Galan *et al.*, 1988; Blakley e Hamilton, 1988; Kent *et al.*, 1990). As deficiências no *status* de ferro também são conhecidas por prejudicarem a função das células do sistema imune, especialmente dos linfócitos (Baliga *et al.*, 1982). O ferro modula a expressão de moléculas de superfície de células T, função fagocítica de macrófagos (Jiang *et al.*, 1993) e atividade de células NK (Nishiya *et al.*, 1982). Além disso, o ferro diminui a atividade do IFN- γ em células mielomonocíticas humanas (Weiss *et al.*, 1992) e reduz a produção de NO em células microgliais murinas (Saleppico *et al.*, 1996). Estudos das funções celulares em situações clínicas de excesso de ferro, como por exemplo, a talassemia, demonstraram função prejudicada ou alterada de células T CD4⁺ (de Sousa, 1989).

Algumas citocinas podem influenciar o metabolismo de ferro e por sua vez o *status* deste metal alterado no organismo pode influenciar a produção das mesmas. O TNF- α possui papel significativo na homeostase de ferro por ser um dos principais fatores na modulação do metabolismo de ferro durante a inflamação. A sua aplicação

em animais experimentais ou em humanos leva a uma redução nas concentrações de ferro sérico (Tanaka *et al.*, 1987). Silver *et al.* (1997) sugeriram que a expressão do gene TNF- α pode ser controlada pelo ferro intracelular. Estes achados demonstraram uma possível interação entre TNF- α e ferro durante a inflamação. A hipoferremia associada à infecção ou inflamação é provavelmente mediada por TNF- α . Ele também inibe a liberação de ferro de macrófagos peritoneais, uma vez que macrófagos de camundongos com excesso de ferro produzem mais TNF- α (Omara *et al.*, 1994).

Kuvibidila *et al.* (2004) demonstraram que a deficiência de ferro em camundongos reduziu os níveis de IL-12p40 e IFN- γ enquanto a subnutrição reduziu os níveis de IL-10. Estes dados sugerem que a deficiência de ferro alterando o balanço entre as citocinas pró e antiinflamatórias pode afetar a imunidade humoral e celular.

No hospedeiro vertebrado, o ferro encontra-se em associação com proteínas ligantes de alta afinidade como a lactoferrina e a transferrina, não estando disponível livremente para os microrganismos (Aisen e Listowsky, 1980). O primeiro *pool* de ferro no organismo é o do ferro associado à hemoglobina; como ela está sempre sendo seqüestrada dentro dos eritrócitos, o ferro não está diretamente disponível para patógenos extracelulares (Bothwell *et al.*, 1979).

A lactoferrina tem uma grande afinidade pelo ferro e está localizada nas superfícies mucosas e secreções exócrinas como muco e lágrimas, que podem, desta maneira dificultar o crescimento dos microrganismos nestas vias de entrada. A transferrina é uma glicoproteína que se encontra no sangue dos hospedeiros vertebrados, constituindo o segundo *pool* de ferro do organismo. Ela é a mais importante proteína de transporte no plasma (Bothwell *et al.*, 1979), e a sua alta afinidade pelo ferro limita a disponibilidade do metal para os microrganismos. O receptor de transferrina (TfR1) é expresso em várias células que requerem o ferro para o seu desenvolvimento. O TfR1 de camundongo é uma glicoproteína de 200 KDa composta de duas cadeias idênticas ligadas a dissulfeto, cada uma sendo capaz de se ligar a transferrina. A ligação da transferrina ao seu receptor seguido pela endocitose do complexo ligante-receptor é o principal mecanismo celular de captação de ferro. O ferro incorporado é estocado também em depósitos de ferritina e os TfR1 são reciclados na superfície da célula. Recentemente, outra molécula com a mesma similaridade estrutural e funcional a TfR1 foi clonada e recebeu o nome de TfR2. O papel de TfR2 no metabolismo de ferro permanece desconhecido, apesar de transfecção dentro de células que perderam o TfR1 resultarem em captação de ferro de

Tf. Em contraste ao TfR1 que é regulado pela concentração de ferro intracelular, o TfR2 não parece ser regulado da mesma maneira (Kawabata *et al.*, 2000).

Como relatado acima, a obtenção de ferro pelos patógenos não é fácil. Para superar esta dificuldade, algumas espécies de bactérias patogênicas produzem algumas moléculas, denominadas sideróforas, que possuem alta afinidade pelo ferro. Estas moléculas de baixo peso molecular competem com a transferrina pelo metal (Neilands, 1981).

O mecanismo básico pelo qual a forma amastigota do *T. cruzi* obtém os micronutrientes do hospedeiro mamífero para sua multiplicação intracelular ainda é desconhecido. Tem-se investigado o papel das proteínas dos hospedeiros, principalmente, a transferrina no transporte destes micronutrientes para estas formas parasitárias. Os receptores de transferrina têm sido encontrados em praticamente todas as células, e aumentam em quantidade com a proliferação das mesmas (Barnes *et al.*, 1980; Weiel *et al.*, 1984). Em trabalhos quando relacionados os receptores do *T. cruzi* para a transferrina humana e o seu papel, Lima e Villalta (1989), mostraram que as formas amastigotas apresentam receptores para esta proteína. O ferro é essencial para o crescimento desta forma parasitária e é obtido da transferrina através da endocitose mediada por receptores.

Embora os patógenos desenvolvam estratégias para a obtenção de nutrientes dentro dos hospedeiros vertebrados, estes por sua vez, desenvolvem também mecanismos para inviabilizar a sobrevivência dos agentes infecciosos por diferentes modos. Weinberg em (1978), observou que em muitas doenças infecciosas ocorre um ajuste no metabolismo de ferro caracterizado pela hipoferremia, onde há redução dos níveis de saturação da transferrina. A hipoferremia é, predominantemente, o resultado do seqüestro de ferro dentro de estoques intracelulares do sistema retículo endotelial (Roeser, 1980; Letendre e Holbein, 1983). Como todos os microrganismos patogênicos requerem ferro para o crescimento e virulência, a resposta hipoferrêmica é protetora porque reduz a disponibilidade do ferro para os patógenos extracelulares (Weinberg, 1978). Dessa maneira, a hipoferremia é um benefício questionável na defesa contra parasitos intracelulares que replicam dentro do sistema fagocitário mononuclear usando os *pools* de ferro intracelular do hospedeiro (Lalonde e Holbein, 1984).

Deste modo, as alterações nos níveis de ferro podem afetar a relação parasito-hospedeiro, se uma quantidade suficiente de ferro não for disponível para um

patógeno, sua propagação poderá se tornar dificultada e a infecção atenuada (Payne e Finkelstein, 1978).

Os dados da literatura em relação à deficiência de ferro e resistência às infecções têm levado alguns investigadores a sugerir duas diferentes hipóteses: de um lado estão aqueles que defendem que a deficiência de ferro predispõe a infecção (Baggs e Miller, 1973; Cummins *et al.*, 1978; Duncombe *et al.*, 1979; Kuvibidila *et al.*, 1981; Humbert e Moore, 1983; Weinberg, 1984; Galan *et al.*, 1988; Blakley e Hamilton, 1988; Kent *et al.*, 1990) e, do outro lado, aqueles que defendem que a deficiência de ferro protege contra a infecção (Sword, 1966; Weinberg, 1974; Murray *et al.*, 1975; Jones *et al.*, 1977; Pushman e Ganzoni, 1977; Murray *et al.*, 1978; Murray *et al.*, 1981; Raventos-Suarez *et al.*, 1982; Lalonde e Holbein, 1984; Harvey *et al.*, 1985; Pollack *et al.*, 1987; Bullen *et al.*, 1991; Griffiths e Bullen, 1999). Trabalhos realizados por estas duas vertentes apoiam tais suposições.

O organismo humano adulto contém de 3 a 5 g de ferro, aproximadamente 2 g como hemoglobina e 8 mg como enzimas. Ambas as formas são muito importantes para a função normal do indivíduo. O ferro é bem conservado pelo organismo; aproximadamente 90% é recuperado e reutilizado extensivamente. Na deficiência de ferro, os valores de transferrina (expressos como capacidade total de ligação de ferro) são elevados, maiores que os normais: $410 \mu\text{g dL}^{-1}$, com saturação de ferro no soro abaixo de 16% (Finch *et al.*, 1982).

Quelantes têm sido utilizados em estudos que avaliam a relação entre doenças e *status* de ferro. As evidências de que quelantes de ferro atenuam as lesões pós-isquêmicas em uma variedade de sistemas orgânicos, inclusive em músculos esqueléticos, documentam a participação do ferro na patogênese da lesão tecidual pós-isquêmica (Ambrosio *et al.*, 1987; Paller *et al.*, 1988; Sardinha, 1994).

Os quelantes de ferro podem também fortemente induzir a transcrição de iNOs e aumentar a liberação de IL-1B em macrófagos alveolares humanos (Rouser *et al.*, 1968; Tang *et al.*, 1997). Estas observações sugerem que tanto o ferro como os seus quelantes podem modular certos mediadores inflamatórios regulando os processos inflamatórios (Rouser *et al.*, 1968).

O Desferal (mesilato de desferrioxamina) foi lançado no mercado em 1963 como um medicamento no tratamento do excesso de alumínio e ferro decorrente da talassemia. Ele vem sendo empregado com sucesso na clínica médica como agente de remoção de ferro em casos de doenças de estoques de ferro, no tratamento de

envenenamento por ferro e como um auxílio na normalização de estoques de ferro (Keberle, 1964). Para ser efetivo, o medicamento deve ser administrado em contínuas infusões parentais com doses diárias de 100 a 150 mg/kg em humanos (Brittenham, 1988). A desferrioxamina (DFA) possui um período curto de meia-vida (12 minutos) no plasma, devido ao seu rápido metabolismo (Aouad *et al.*, 2002) e tem que ser administrado lentamente por um determinado tempo (Summers *et al.*, 1979; Lee, 1993).

A DFA é um sideróforo hexadentado natural que contém tihdroxamado produzido por *Streptomyces pylosis* (Keberle, 1964; Barry *et al.*, 1974) capaz de promover a excreção de ferro do organismo pela formação de complexos predominantemente com os íons trivalentes do ferro. Em decorrência de suas propriedades quelantes, a DFA é capaz de deslocar o ferro na forma livre, encontrado tanto no plasma quanto nas células, dando origem ao complexo ferrioxamina. Uma vez ligado, o ferro é inativado metabolicamente não resultando na formação de espécies ativas de oxigênio.

A DFA tem sido empregada em estudos que buscam avaliar a relação entre infecção e *status* de ferro (Dhur *et al.*, 1989) e atua tanto no meio intracelular quanto no extracelular. Dois mecanismos são propostos para esta ação: indução da deficiência de ferro por limitar sua disponibilidade dentro da célula ou interferência direta com a aquisição de ferro pelo parasito (Hershko e Peto, 1988).

Em relação ao sistema imune foi demonstrado que a DFA bloqueia a expressão do receptor de IL-2 em células T humanas e inibe a síntese de DNA como um resultado da inativação da ribonucleotídeo redutase (Carotenuto *et al.*, 1986). Este quelante também apresenta efeitos antivirais inibindo a replicação do citomegalovírus *in vitro* (Cinatl *et al.*, 1994, 1995) sendo efetivo na redução da lesão mediada por radicais livres posterior ao trauma (Shadid *et al.*, 1998; Martelius *et al.*, 1999). O tratamento com DFA suprime os sintomas clínicos e patológicos da encefalomielite alérgica em ratos, com redução das lesões inflamatórias no sistema nervoso central e da resposta de células T (Bower *et al.*, 1984). Tanjii *et al.* (2001) demonstraram que a DFA aumenta a expressão de cyclooxygenase-2 e prostaglandina em macrófagos humanos.

Muitos agentes quelantes podem ter uma potencial atividade tripanomicida porque fazem à seleção da privação do ferro que podem inibir a proliferação de certos patógenos (Cabantchick *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1997; Cinque *et al.*, 1998).

Em relação a doenças parasitárias a DFA apresenta efeitos inibidores no crescimento do *Plasmodium falciparum* (Hershko e Peto, 1988) e das formas

sangüíneas do *T. brucei* (Breidbach *et al.*, 2002), sendo também considerada uma droga promissora contra o *T. gondii* em camundongos (Mahmoud, 1999). Em relação ao *T. cruzi*, observou-se redução da patogenicidade em camundongos infectados pela cepa Brasil do *T. cruzi* (Lalonde e Holbein, 1984), infecção branda com a cepa YuYu e ausência de alterações na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados pela cepa Y (Pedrosa *et al.*, 1990).

Diversos fatores inerentes ao hospedeiro, fatores dependentes do parasito como o inóculo e cepa utilizada podem conferir diferenças no que se refere ao tropismo celular, parasitemia e capacidade de produzir lesões. Segundo Brener (1977, 1985) a cepa Y produz elevado pico de parasitemia dos sete aos doze dias de infecção, alta taxa de mortalidade, intenso parasitismo no baço e células fagocíticas do fígado nos primeiros estágios de infecção e mitotropismo nos estágios mais tardios. A cepa Y é considerada reticulotrópica, parasitando baço, fígado e medula óssea (Melo e Brener, 1978).

Os primeiros trabalhos correlacionando o *T. cruzi* com as alterações nos níveis de ferro e infecção foram realizados por Lalonde e Holbein (1984) e por Loo e Lalonde (1984). Eles observaram que os camundongos infectados com (10^3 ou 10^4) formas sangüíneas da cepa Brasil do *T. cruzi* e com estoques intracelulares de ferro aumentados pela injeção de ferro-dextran (5 mg/5 dias dpi) apresentaram maior mortalidade. O ferro-dextran (ferric hydroxide dextran complex) é amplamente utilizado para aumentar os níveis de ferro no corpo (Holbein *et al.*, 1979). Por outro lado, a exaustão dos estoques de ferro do hospedeiro com DFA (10 mg/ 5^o e 6^o dpi) e dieta deficiente de ferro reduziu a patogenicidade.

Também através de estudos sobre os efeitos da deficiência e da suplementação de ferro na evolução da infecção experimental de camundongos por diferentes cepas do *T. cruzi*, Pedrosa *et al.* (1990) apresentaram resultados que variaram em decorrência do tipo da cepa utilizada, cepa Y e CL (1.400 formas sangüíneas), cepa YuYu (15.000 formas sangüíneas). O tratamento com ferro-dextran (5 mg/5^o dpi) resultou em maior parasitemia e mortalidade com a cepa Y, maior parasitemia com a cepa CL e nenhum efeito com a cepa YuYu. O tratamento com DFA (10mg/5^o dpi) não provocou alteração com as cepas Y e CL e uma infecção branda com a cepa YuYu. Posteriormente, Pedrosa *et al.* (1993), em trabalhos utilizando camundongos convencionais e gnotobióticos, obtiveram os mesmos resultados em relação à cepa Y do *T. cruzi*.

Resultados obtidos em nosso laboratório por Arantes *et al.*, 2007 mostram que o tratamento com a DFA (5 mg/animal/dia 14 dias antes da infecção e por mais 32 dpi) em camundongos infectados com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, diminuiu o número de parasitos circulantes, assim como a taxa de mortalidade dos animais infectados, no entanto, não afetou o parasitismo tecidual. O tratamento com a DFA reduziu o peso dos animais infectados e manteve o peso cardíaco possivelmente por desencadear uma resposta imune mais precoce, constatada pela maior reatividade do baço e linfonodo no 14^o dpi.

Estima-se que há mais de dois bilhões de pessoas no mundo com anemia, o que representa 1/3 da população mundial sendo a prevalência maior em países em desenvolvimento. Este agravo não é problema exclusivo de populações carentes, sendo considerado uma endemia em expansão em todos os segmentos sociais. (Heijblom e Santos, 2007).

Estes fatos nos levam a crer que indivíduos portadores de anemia ferropriva por verminoses, desnutrição, menstruação excessiva, gestação e lactação podem desenvolver uma infecção distinta quando comparados a indivíduos que possuem estoques de ferro normais.

Diante destes fatos, este trabalho propõe avaliar o efeito do tratamento com Benzonidazol sobre o curso da infecção pela cepa y do *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos à alteração dos estoques de ferro pelo uso da desferrioxamina.

A hipótese levantada é que em um indivíduo infectado pelo *T. cruzi* e com alteração dos estoques de ferro o tratamento com Bz deve apresentar uma eficácia superior ao observado em indivíduos com estoques normais.

2.1 - Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com Benzonidazol sobre o curso da infecção pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos à alteração dos estoques de ferro pelo uso da desferrioxamina.

2.2 - Objetivos específicos

Nos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, tratados com DFA e/ou Bz, determinar:

Parâmetros biológicos

- Curva de parasitemia, período pré-patente, período patente, níveis de parasitemia e a taxa de mortalidade;

Critério de cura

- Hemocultura, ELISA e PCR nos animais que sobreviverem à fase aguda da infecção.

Avaliação dos estoques de ferro

- Níveis de hemoglobina antes da infecção e semanalmente durante o período de tratamento;
- Níveis de ferro sérico e tecidual (fígado) no 10^o e 16^o dia após a infecção.

Avaliação anátomopatológica

- Peso relativo e parasitismo tecidual no coração, fígado, baço e linfonodo no 10^o e 16^o dia após a infecção;
- Processo inflamatório no coração e fígado no 10^o e 16^o dia após a infecção.

3.1 - Animais e tratamentos utilizados

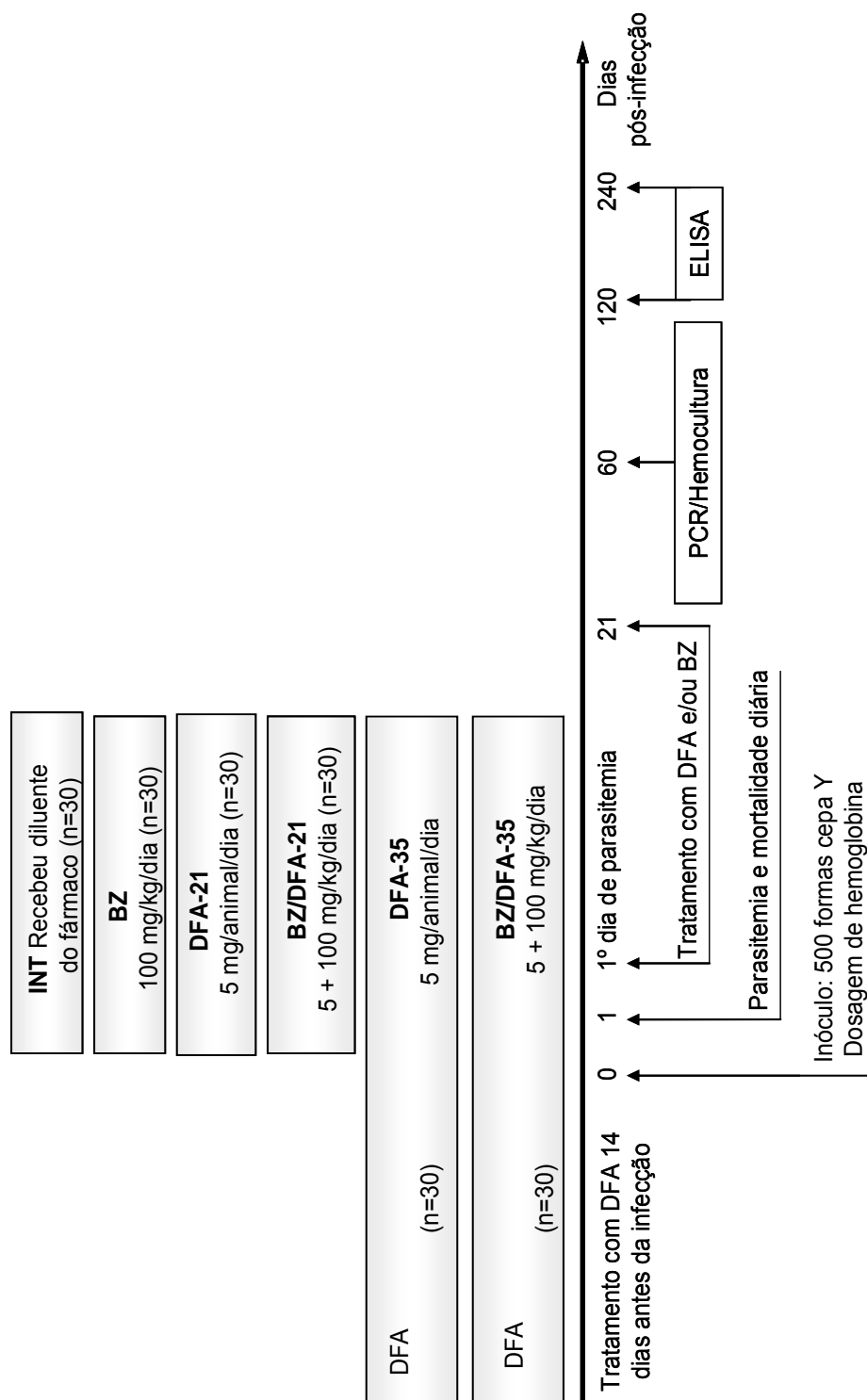
Para a realização do experimento foi utilizado um total de 200 camundongos Swiss machos, com cerca de trinta dias de idade e, aproximadamente, 20 g de peso corporal. Para a avaliação da parasitemia diária e mortalidade, foram utilizados 72 animais do total. Para a necrópsia realizada no 10^o e 16^o dpi foram utilizados 70 animais do total. Para a realização das técnicas de hemocultura, PCR e ELISA, os animais (58) que sobreviveram à fase aguda da infecção foram utilizados.

Os camundongos foram alimentados durante os 35 dias de experimentação com ração comercial e divididos em sete grupos experimentais: (1) não infectados e não tratados - **NINT**; (2) infectados e não tratados - **INT**; (3) infectados e tratados com Bz - **BZ**; (4) infectados e tratados com DFA por 21 dias - **DFA-21**; (5) infectados e tratados com Bz e DFA - **BZ/DFA-21**; (6) infectados e tratados com DFA por 35 dias - **DFA-35** e (7) infectados e tratados com Bz e DFA - **BZ/DFA-35**. O grupo NINT continha 20 animais e os demais 30.

Os animais tratados dos grupos DFA-21 e BZ/DFA-21 receberam o quelante de ferro pela via intraperitoneal (0,05 mL) no primeiro dia de parasitemia patente e nos 21 dias pós-infecção (Figura 1). Os animais dos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35 receberam a DFA pela via intraperitoneal (0,05 mL) durante 14 dias que precederam à infecção e nos 21 dias pós-infecção.

Os camundongos pertencentes aos grupos somente infectados receberam a mesma quantidade do diluente do medicamento (água para injeção).

O tratamento com Bz foi realizado utilizando-se a seguinte metodologia: o comprimido foi macerado liberando 100mg do princípio ativo, que foi ressuspenso em 10 mL de água destilada em goma arábica obtendo-se uma concentração final de 10 mg/mL. Os animais dos grupos BZ, BZ/DFA-21 e BZ/DFA-35 receberam por via oral, através de gavagem utilizando agulha especial para tratamento, 100mg/Kg/dia cada, em dose única, por 21 dias consecutivos começando pelo primeiro dia de parasitemia. Os camundongos eram pesados semanalmente para que recebessem a dose individualizada, de acordo com seu peso corporal.



10º e 16º dia – necrópsias, dosagem de ferro sérico e tecidual.

Figura 1 - Delineamento experimental. Camundongos Swiss machos (n=200), infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35.

3.2 - Infecção e parâmetros biológicos avaliados

Após 14 dias de tratamento com a desferrioxamina nos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35, os animais pertencentes aos seis grupos experimentais foram inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*.

3.2.1 - Curva de parasitemia

A parasitemia foi determinada diariamente a partir do 4^o dia após a infecção até a negatização por 5 dias consecutivos segundo a metodologia de Brener (1962). Cinco μ L de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental empregando a média diária da parasitemia detectada dos animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneas por 0,1mL de sangue e os seguintes parâmetros foram também avaliados:

Período pré-patente (PPP)

O PPP corresponde ao período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia de detecção do parasito no sangue periférico do animal.

Período patente (PP)

O PP corresponde ao período compreendido entre o primeiro dia de exame a fresco positivo até a completa negatização da parasitemia e foi expresso em dias.

Pico máximo de parasitemia (PMP)

O PMP corresponde ao máximo de parasitemia e foi expresso em número de tripomastigotas sanguíneas/0.1 mL de sangue.

Dia do pico máximo de parasitemia (DPMP)

O DPMP corresponde ao dia de ocorrência do máximo de parasitemia e foi expresso em dias.

3.2.2 - Taxa de mortalidade

Para determinação da taxa de mortalidade os animais foram acompanhados diariamente até 40 dpi e a mortalidade registrada, sendo expressa em porcentagem cumulativa.

3.2.3 - Hemocultura

A hemocultura foi realizada de acordo com a metodologia de Filardi e Brener (1987). Para este exame, cerca de 0,5 mL de sangue foram coletados assepticamente do seio venoso retro-orbital com pipeta de Pasteur dos animais que sobreviveram à fase aguda da infecção (n=52). O sangue foi distribuído em dois tubos contendo 3 mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964).

Os tubos foram incubados em estufa a 28°C e uma gota do sedimento foi examinada ao microscópio para detectar o parasito aos 30, 60 e 90 dias após incubação. A ausência de parasitemia, a negatificação da hemocultura e da PCR foram os critérios de cura parasitológicos adotados.

3.2.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi utilizada a técnica de PCR de Gomes *et al.* (1998) com ligeiras modificações. Foram coletados 200µl de sangue do plexo venoso retro-orbital dos animais que sobreviveram à fase aguda da infecção (n=52), assepticamente. Os sangues foram acrescentados ao dobro de volume de Guanidina/EDTA 6,0 M e conservados a temperatura ambiente (Ávila *et al.*, 1991). Uma semana depois, o lisado foi fervido 7 minutos e mantido à temperatura ambiente. A extração de DNA das amostras foi realizada com fenol-clorofórmio, posteriormente precipitado com etanol, secado, ressuspensão em água e conservado a 4°C até o dia da amplificação Gomes *et al.* (1998). Após a extração, o DNA foi amplificado, utilizando-se os iniciadores específicos para *T. cruzi* (S35 = 5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA 3' e S36 = 5'GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT 3'), que se ancoram na região conservada do kDNA, capazes de amplificar um fragmento de 330 pares de base. Em síntese: 2µl da solução de DNA de cada amostra foi adicionada a solução contendo 10mM de Tris-HCL (pH 9,0); 75 mM de KCL; 1,5 Mm de Mg CL₂; 0,1% de Triton 100x; 0,25mMm de

cada dNTP (Sigma Company Ltda, USA); 10pmol de cada iniciador (#35 e #36), 0,5U de taq DNA polimerase (Platinum, Invitrogen, SP; Brasil) e água suficiente para completar 11µl. Esta mistura foi coberta com 30 µl de óleo mineral e submetida ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação inicia a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos contendo um passo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, um de anelamento a 64°C por um minuto e um passo de extensão a 72°C por 1 minuto. Para finalizar, uma de extensão a 72° C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizados com coloração pela prata (Santos *et al.*, 1993).

3.2.5 - Pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi* pela ELISA

Foram coletados 200ul de sangue do plexo venoso retro-orbital dos animais que sobreviveram à fase aguda da infecção (n=52), para realização dos testes de ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY), centrifugados para obtenção do soro que foi diluído a 1:80 em PBS. Na reação foi utilizado antígeno alcalino obtido de cultura exponencial da cepa Y de *T. cruzi* em meio LIT (Vitor e Chiari, 1987) e conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase.

A ELISA foi realizada segundo a técnica de Voller *et al.* (1976), utilizando-se microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato sensibilizados com 3µg de proteína por poço diluída em solução tampão carbonato, pH 9,6. Após incubação por 18h, a 4°C, o excesso de solução antigênica foi removido por quatro lavagens sucessivas com solução salina contendo Tween 20 a 0,05%. Após a lavagem, os soros foram incubados a 37°C por 45min.

A seguir, foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase. As placas foram incubadas por 45min, a 37°C, e então se adicionou o substrato (ofenilodiamino - OPD - Sigma). Entre as etapas da reação, as placas de ELISA foram submetidas a quatro lavagens com PBS-Tween 20. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N (32µl por poço) e as leituras foram realizadas no leitor de microplaca (BIO RAD, Modelo 3550) com filtro de 490nm.

A ELISA foi considerada positiva quando a leitura, em densidade ótica, foi maior do que a média, somada a duas vezes o desvio padrão do valor obtido de 10 soros de animais não infectados pelo *T. cruzi*, testados em paralelo aos soros

avaliados (Gusmão *et al.*, 1984). Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as placas. A negativação da ELISA foi o critério de cura sorológico adotado.

3.3 - Parâmetros relacionados à avaliação do ferro

3.3.1 - Ferro tecidual

As dosagens de ferro tecidual foram realizadas aos 10^o e 16^o dpi utilizando o método de orto-fenantrolina. A hidroxilamina reduz o ferro 3⁺ a ferro 2⁺ e este é associado com orto-fenantrolina que dá a cor na amostra que é correspondente à concentração de ferro. Durante a necrópsia foram coletados 100 mg do fígado de cada animal que foram submetidos à digestão em 2,0 mL de ácido nítrico concentrado em tubos de ensaio. Estes foram colocados no digestor Kieldahl a 110°C.

Logo após a evaporação do ácido, o resíduo seco foi ressuspenso em 2,0 mL de ácido clorídrico concentrado, sendo o material transferido para um balão volumétrico e o volume ajustado para 10 mL com água deionizada.

A 0,5 mL dessa solução foram adicionados 0,2 mL de solução de hidroxilamina 10%, 4,1 mL de tampão acetato 2M pH 3,5 e 0,2 mL de orto-fenantrolina a 0,1%. Para a leitura no espectrofotômetro utilizou-se um branco contendo 0,5 mL de água deionizada, 0,2 de hidroxilamina, 4,1 mL de tampão acetato pH 3,5 e 0,2 mL de orto-fenantrolina. A leitura foi realizada a 510 nm. O padrão foi obtido a partir de uma curva feita com uma solução de padrão de ferro 500 µg/mL. Os valores obtidos em unidades convencionais (µg/dL) foram transformados em unidades internacionais (µmol/L), sendo multiplicados por 0,179.

3.3.2 - Ferro sérico

As dosagens de ferro no soro foram realizadas aos 10 e 16 dias, de acordo com Goodwin *et al.* (1966) com modificações utilizando-se Kit comercial (Labtest, Cat 38, ANVS: 10009010014, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Em pH ácido os íons férricos são dissociados e reduzidos a íons ferrosos por ação da hidroxilamina. A intensidade da cor magenta brilhante formada após a adição da Ferrozine é proporcional à quantidade de ferro na amostra.

Em 0,250 μL de tampão fornecido pelo Kit foi adicionado 62,5 μL de soro para cada teste, para o padrão foi adicionado 62,5 μL de padrão de ferro sérico e para o branco foi adicionado 62,5 μL de água destilada que foi usado para zerar o espectrofotômetro. Essa mistura foi homogenizada e a leitura da absorbância realizada a 560 nm sendo obtida a absorbância 1 (A1). Após essa leitura, foi adicionada, em cada tudo, 6,2 μL de solução de ferrozine e o sistema incubado a 37°C em banho-maria por 10 minutos. Logo após foi realizada a segunda leitura da absorbância 2 no mesmo comprimento de onda (A2). Para se obter a concentração de ferro nas amostras, A1 foi subtraído de A2, dividido pela absorbância do padrão e multiplicado pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais ($\mu\text{g}/\text{dL}$) foram transformados em unidades internacionais ($\mu\text{mol}/\text{L}$), sendo multiplicados por 0,179.

3.3.3 - Níveis de hemoglobina

A avaliação dos níveis de hemoglobina foi realizada antes da infecção e aos 7^o, 14^o e 21^o dpi, utilizando o Kit comercial (Labtest, Cat 43, Lagoa Santa, MG, Brasil).

O ferro, no estado ferroso, do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado para o estado férrico pelo ferriocianeto, contido no reagente de cor fornecido pelo Kit, formando hemiglobina (Hi). Esta combina-se com o cianeto ionizado, também contido no reagente de cor, e produz o cianeto de hemoglobina (HiCN), que é submetido à leitura no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 540 nm.

Nos ensaios foram utilizados 5 μL de sangue coletados da veia caudal dos animais de cada grupo experimental que foi misturado a 1.250 μL do reagente de cor. Para o padrão foi misturado 1.250 μL do reagente a 5 μL de padrão de hemoglobina. A fim de se obter a concentração de hemoglobina na amostra, a absorbância da amostra foi dividida pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores foram obtidos em $\mu\text{g}/\text{dL}$.

3.4 - Necrópsias, coleta, fixação e processamento do material

Todos os camundongos foram pesados semanalmente e no dia da necrópsia. Os animais foram necropsiados no 10^o e 16^o dpi por deslocamento cervical. Cada animal recebeu um número que apenas foi decodificado ao final de todos os experimentos.

Foi realizada a retirada do coração, baço, fígado e linfonodos *in totum*. Estes órgãos foram imediatamente pesados. Posteriormente foram realizados cortes transversais dos mesmos, com a obtenção de fragmentos com aproximadamente 2 mm de espessura, fixados em formol tamponado a 10% (pH 7,2) por 24 horas.

Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois (70%, 80%, 90% e três trocas de álcool absoluto), diafanizados em duas trocas de xilol, embebidos e incluídos em parafina histológica.

Os blocos de parafina foram submetidos a microtomia e de cada bloco obteve-se cortes com espessura de 3 µm. Foram confeccionadas 2 lâminas, a primeira foi corada pelo método da Hematoxilina-Eosina. Para quantificar o parasitismo tecidual no coração, baço, fígado e linfonodo aplicou-se a técnica de imuno-histoquímica peroxidase anti-peroxidase na segunda lâmina.

3.5 - Técnica de Imuno-histoquímica para identificação do *T. cruzi*

Os cortes histológicos foram desparafinizados em duas trocas de xilol de 15 minutos cada, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70 %) por três minutos cada. Seguiu-se lavagem em água corrente por cinco minutos e em PBS pH 7,2-7,4 por cinco minutos.

Posteriormente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em um banho de 30 minutos em PBS/Peróxido de Hidrogênio (240 mL de PBS e 10 mL de Peróxido de Hidrogênio a 30%) à temperatura ambiente. Os cortes histológicos passaram, então, por três banhos consecutivos, de cinco minutos cada, em PBS.

Após a secagem das bordas dos cortes com papel absorvente, aplicou-se o soro normal de cabra diluído na proporção 1:40 em PBS, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações cruzadas inespecíficas.

Em seguida secou-se o excesso de soro normal de cabra e as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (anti-*T. cruzi* produzido em coelho, diluição 1:1000 em PBS/Albumina 0,1%) em câmara úmida à 37°C, por uma hora seguida de três banhos de cinco minutos cada em PBS.

As bordas dos cortes foram secas novamente e aplicou-se o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, produzido em cabra). A seguir, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos. As lâminas retiradas da câmara úmida receberam novamente três banhos de cinco minutos cada, em PBS.

Procedeu-se a secagem de suas bordas, a aplicação do complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP diluído 1:250 em PBS/Albumina 0,1%) e as lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente seguida de três banhos de cinco minutos cada, em PBS.

A revelação da reação da peroxidase foi obtida através da incubação em solução de DAB (50 mg de Diaminobenzidina em 250 mL de PBS e 500 µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante cinco minutos. No intuito de interromper a revelação os cortes foram mergulhados em PBS por três vezes. Posteriormente foram lavados em água corrente por cinco minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavados em água corrente por cinco minutos e desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e montados em Entellan (Merck^R).

3.6 - Quantificação do parasitismo tecidual

As áreas marcadas do coração, fígado, baço e linfonodo foram quantificadas em 10 imagens aleatórias (área total percorrida = $1,5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40x foram digitalizadas através da microcâmera Leica DM5000B e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.1 R1). Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3. O parasitismo tecidual foi determinado pelas áreas marcadas presentes nos animais infectados pelo *T. cruzi*.

3.7 - Quantificação da inflamação no coração e fígado

Todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração e fígado foram quantificados em 20 imagens aleatórias (área total percorrida = $3 \times 10^7 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40x foram digitalizadas através da microcâmara Leica DM5000B e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.1 R1). Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3. O processo inflamatório foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não infectados, acrescido de um desvio padrão, os animais infectados pelo *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca ou hepática.

3.8 - Análise estatística

A parasitemia foi analisada pelo teste não-paramétrico Kolmogorov-Sminorv (KS), que compara a área sob a curva entre duas amostras (Conares,1980).

Os demais resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram testados pela ANOVA – oneway e teste *t de student*. As análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 4.0. Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias.

Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4.1 - Curva de parasitemia

A parasitemia dos diferentes grupos de animais infectados pelo *T. cruzi* tratados ou não está representada no Gráfico 1. As curvas de parasitemia nos grupos INT, DFA-21 e 35 foram significativamente maiores em relação aos grupos BZ, BZ/DFA-21 e BZ/DFA-35. O grupo BZ/DFA-21 mostrou uma redução significativa na parasitemia quando comparado com o grupo BZ. Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros relacionados à curva de parasitemia. Não foram observadas diferenças significativas entre os períodos pré-patente nos seis grupos avaliados. Por outro lado, o período patente nos grupos BZ (PP=4 dias) e BZ/DFA-21 (PP=7 dias) foi significativamente menor quando comparado aos grupos INT (PP= 21 dias), DFA-21 (PP= 13 dias) e DFA-35 (PP= 25 dias). No grupo BZ/DFA-35 (PP=9 dias) foi observada redução do período patente em relação aos grupos INT e DFA-35. O pico de parasitemia dos animais não tratados ocorreu no 11^o dia e dos animais tratados no 7^o dia para os grupos BZ/DFA-21 e BZ/DFA-35, no 8^o dia para o grupo BZ e no 9^o dia para os grupos DFA-21 e 35. A média dos níveis de parasitemia nos animais dos grupos BZ, BZ/DFA-21 e 35 (111.000, 16.000 e 61.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue, respectivamente) foi 9, 58 e 15 vezes menor que a observada no grupo INT (932.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue).

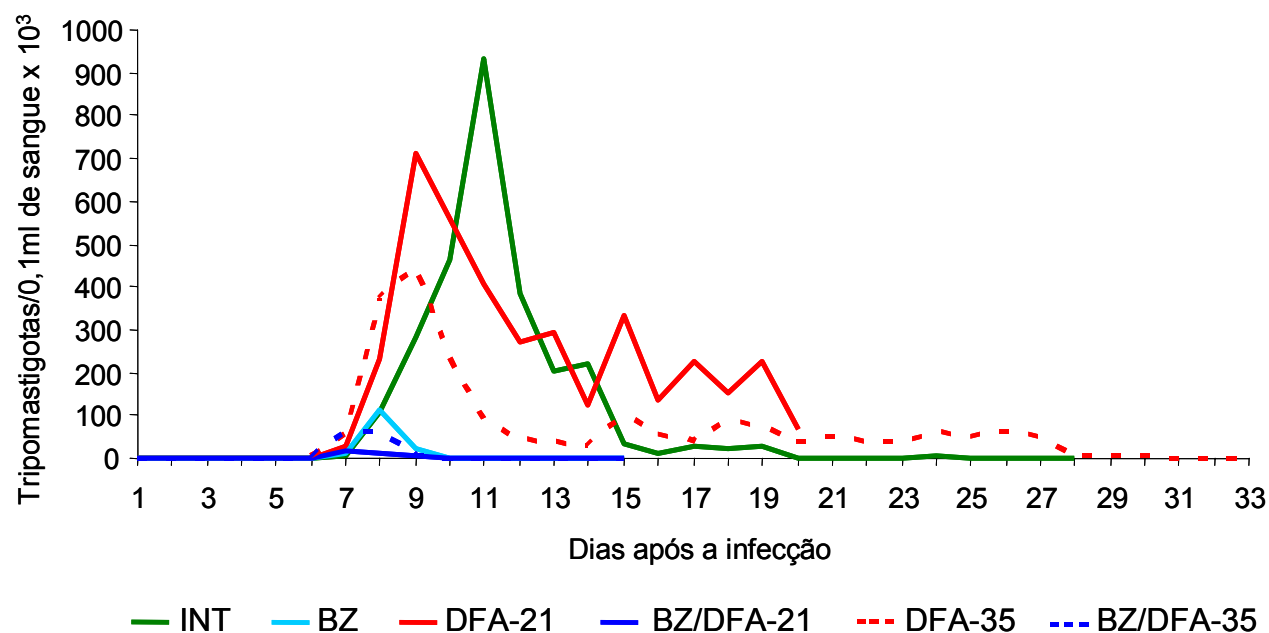


Gráfico 1 - Curvas das médias de parasitemia de camundongos Swiss (n=72) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35.

Tabela 1 - Cinética da parasitemia de camundongos Swiss (n=72) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35.

Grupos	Período pré-patente (dias)	Período patente (dias)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia
INT	7	21	11	932.000
BZ	7	4* [#]	8	111.000
DFA-21	7	13	9	710.000
BZ/DFA-21	7	7* [#]	7	16.000
DFA-35	6	25	9	447.000
BZ/DFA-35	6	9*	7	61.000

[#] diferença significativa em relação ao grupo DFA-21.

* diferença significativa em relação aos grupos INT e DFA-35.

4.2 - Taxa de mortalidade

No Gráfico 2 estão representadas as taxas de mortalidade cumulativa dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais avaliados pelo *T. cruzi*. Os animais pertencentes ao grupo INT e DFA-21 vieram a óbito a partir do 12^o dpi e apresentaram taxa de mortalidade de 100%. Por outro lado, os animais do grupo BZ/DFA-35 apresentaram taxa de mortalidade de 0% enquanto os animais do grupo BZ vieram a óbito a partir do 18^o dpi e apresentaram taxa de mortalidade de 25%. Já os animais do grupo BZ/DFA-21 vieram a óbito a partir do 12^o dpi (mortalidade= 25%) e aqueles do grupo DFA-35 a partir do 15^o dpi (mortalidade= 70%).

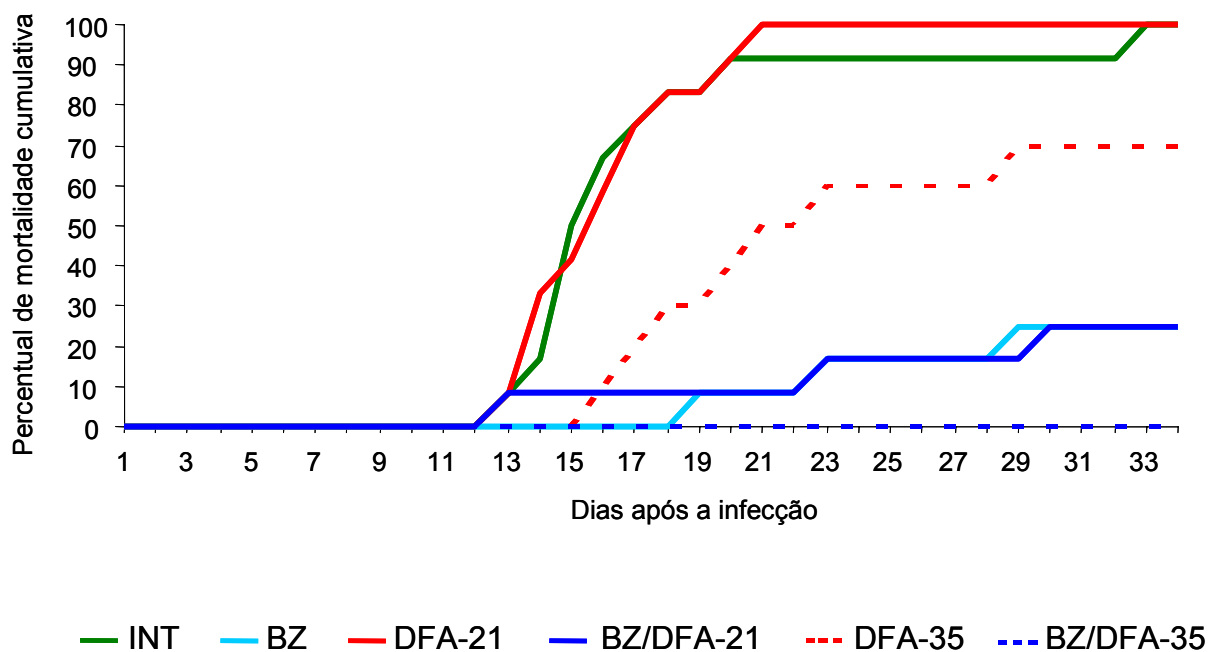


Gráfico 2 - Taxa de mortalidade cumulativa de camundongos Swiss (n=72) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35.

4.3 - Hemocultura

A hemocultura foi avaliada aos 60 dpi nos animais (n=52) que sobreviveram à fase aguda da infecção sendo observada taxa de hemocultura negativa em 41%, 58%, 83% e 47% dos animais dos grupos BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Número e porcentagem de animais (n=52) que sobreviveram à infecção pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e que apresentaram resultados negativos de Hemocultura (60 dpi), PCR (60 dpi) e ELISA (120 e 240 dpi).

Número e porcentagem de animais que apresentaram resultados negativos				
Critério de cura	Hemocultura	PCR	ELISA	
Dpi	60	60	120	240
BZ (n=17)	7 (41%)	4 (24%)	3 (18%)	2 (12%)
BZ/DFA-21 (n=12)	7 (58%)	7 (58%)	0 (0%)	0 (0%)
DFA-35 (n=6)	5 (83%)	4 (67%)	1 (17%)	1 (17%)
BZ/DFA-35 (n=17)	8 (47%)	6 (35%)	0 (0%)	0 (0%)

n= número de animais; dpi: dias pós-infecção.

4.4 - PCR

A PCR foi realizada aos 60 dpi sendo verificados 24%, 58%, 67% e 35% de reações negativas nos grupos BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35, respectivamente.

4.5 - ELISA

Anticorpos específicos, da classe IgG, foram detectados no soro de todos os animais dos grupos BZ/DFA-21 e 35 aos 120 e 240 dpi. No grupo BZ três animais e no grupo DFA-35 um animal apresentaram sorologia negativa. Na fase crônica apenas um animal do grupo DFA-35 e dois do grupo BZ apresentaram sorologia negativa.

De acordo com o critério de cura adotado neste trabalho, ou seja, hemocultura, PCR e ELISA negativos, apenas um animal do grupo BZ foi considerado curado.

4.6 - Ferro tecidual

A dosagem de ferro hepático está representada no Gráfico 3. Tanto no 10^o quanto no 16^o dpi verificou-se redução significativa da concentração de ferro hepático nos animais pertencentes a todos os grupos infectados, independente do esquema de tratamento, quando comparados aos animais do grupo NINT.

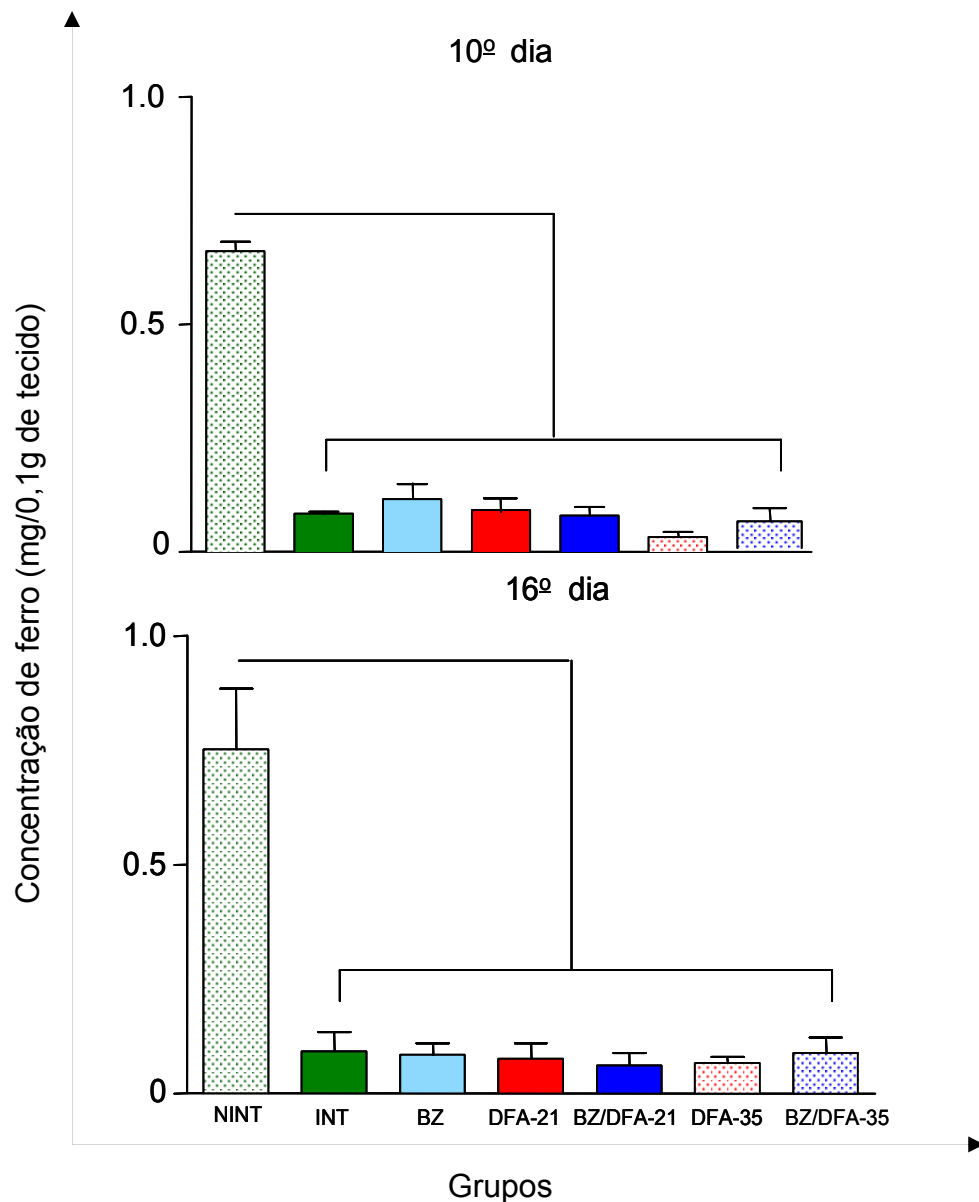


Gráfico 3 - Média da quantidade de ferro hepático no 10^o e 16^o dia nos camundongos Swiss (n=70) infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas.

4.7 - Dosagem de ferro sérico

No Gráfico 4 está representada a dosagem de ferro sérico realizada no 10^o e 16^o dia. O grupo BZ/DFA-35 apresentou aumento significativo na concentração de ferro sérico quando comparado aos grupos INT e BZ no 10^o dpi. No 16^o dpi observou-se aumento significativo na concentração de ferro sérico no grupo BZ/DFA-35 em relação aos demais grupos. O grupo DFA-35 apresentou aumento significativo na concentração de ferro sérico quando comparado aos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21 e BZ/DFA-21. Foi observado aumento na concentração de ferro sérico do 10^o para o 16^o no grupo BZ/DFA-35.

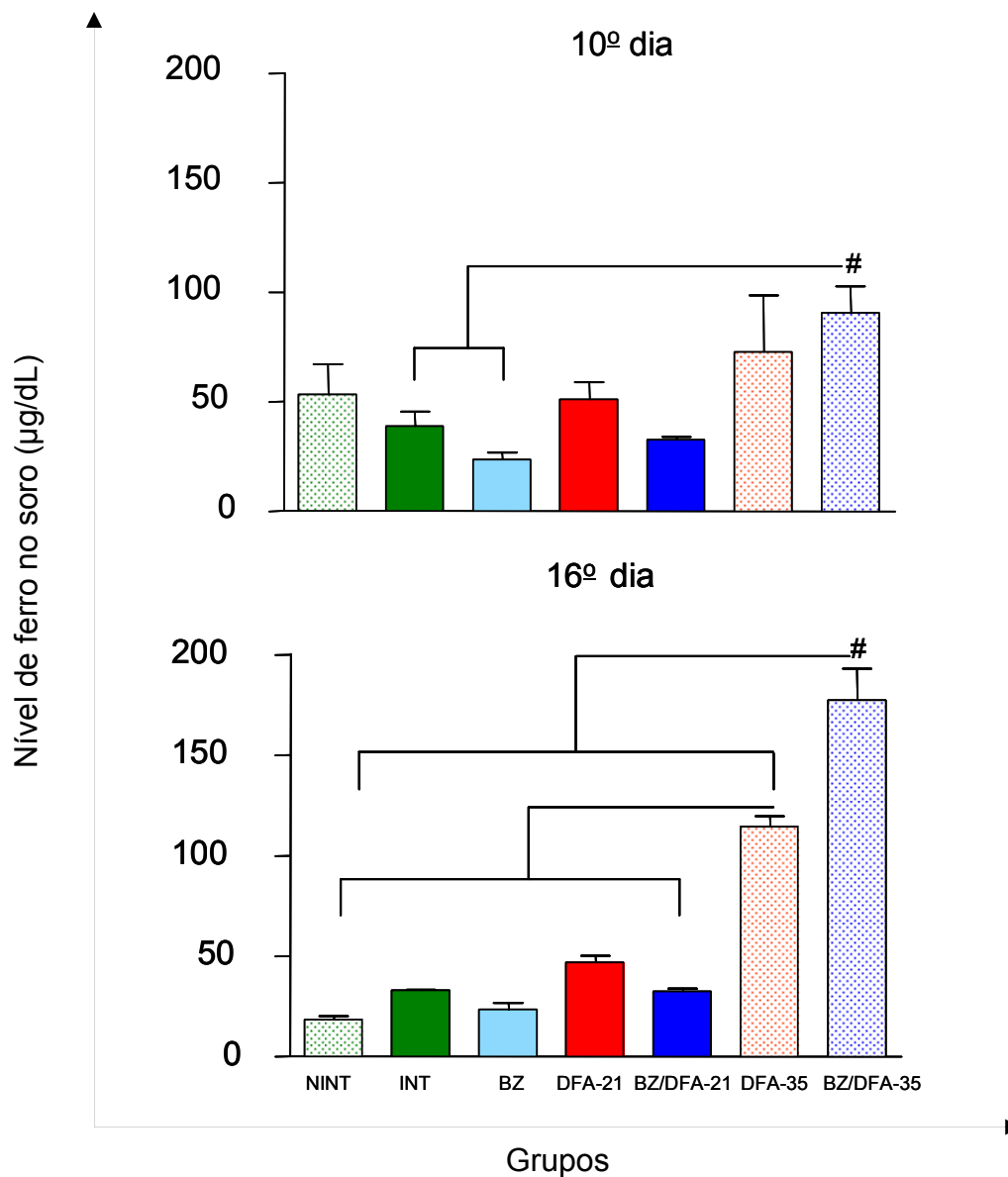


Gráfico 4 - Média da dosagem de ferro sérico realizada no 10º e 16º dia nos camundongos Swiss (n=70) infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas. # indica diferença significativa entre o 10º e 16º dpi.

4.8 - Níveis de hemoglobina

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de hemoglobina avaliados antes da infecção e no 7^o e 21^o dia. No Gráfico 5 está representada a dosagem de hemoglobina realizada no 14^o dia de infecção onde observa-se aumento significativo da concentração de hemoglobina nos animais do grupo BZ/DFA-35 em relação aos demais e uma redução no grupo DFA-35 quando comparado ao grupo BZ/DFA-21.

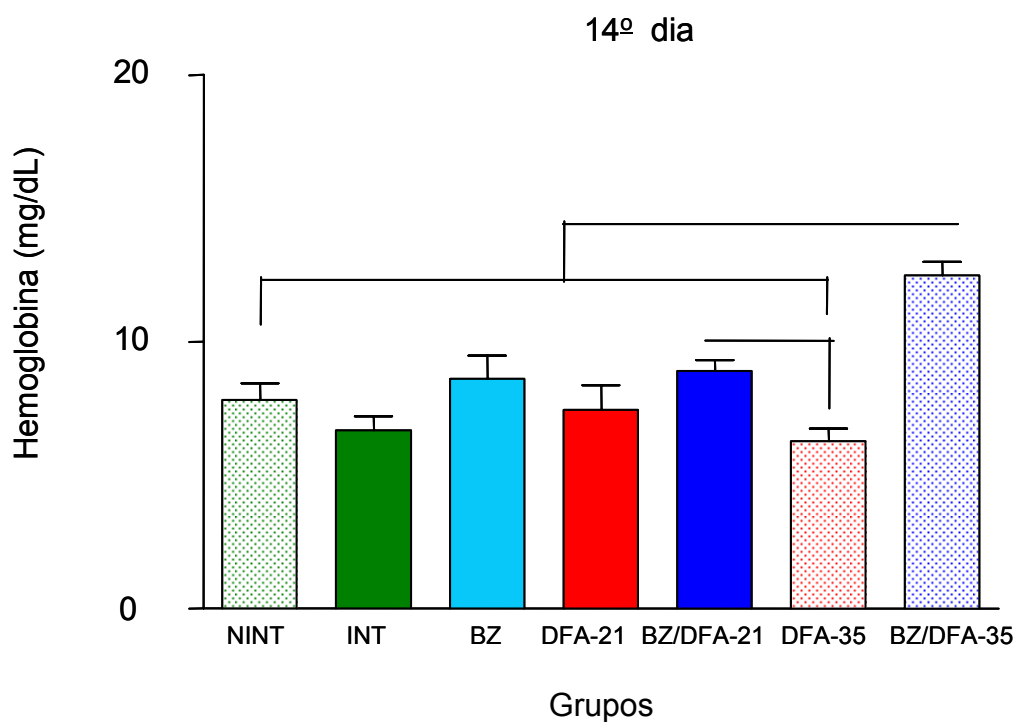


Gráfico 5 - Média da dosagem de hemoglobina realizada no 14^o dia nos camundongos Swiss (n=70) infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas.

4.9 - Peso dos animais

Antes da infecção todos os animais apresentaram peso corporal similar. No Gráfico 6 está representada a média do peso dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais no 7^o, 14^o e 21^o dia.

No 7^o dia observa-se aumento significativo no peso dos animais do grupo DFA-35 em relação aos grupos NINT, INT, BZ e DFA-21 e do grupo BZ/DFA-35 quando comparado aos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21 e BZ/DFA-21. No grupo BZ/DFA-21 observa-se aumento de peso quando comparado ao grupo NINT.

No 14^o dia observa-se aumento significativo no peso dos animais do grupo DFA-35 em relação aos grupos INT, BZ e DFA-21, e do grupo BZ/DFA-35 quando comparado aos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21 e BZ/DFA-21.

No 21^o dia observa-se aumento significativo no peso dos animais do grupo BZ/DFA-35 em relação aos grupos NINT, BZ e BZ/DFA-21.

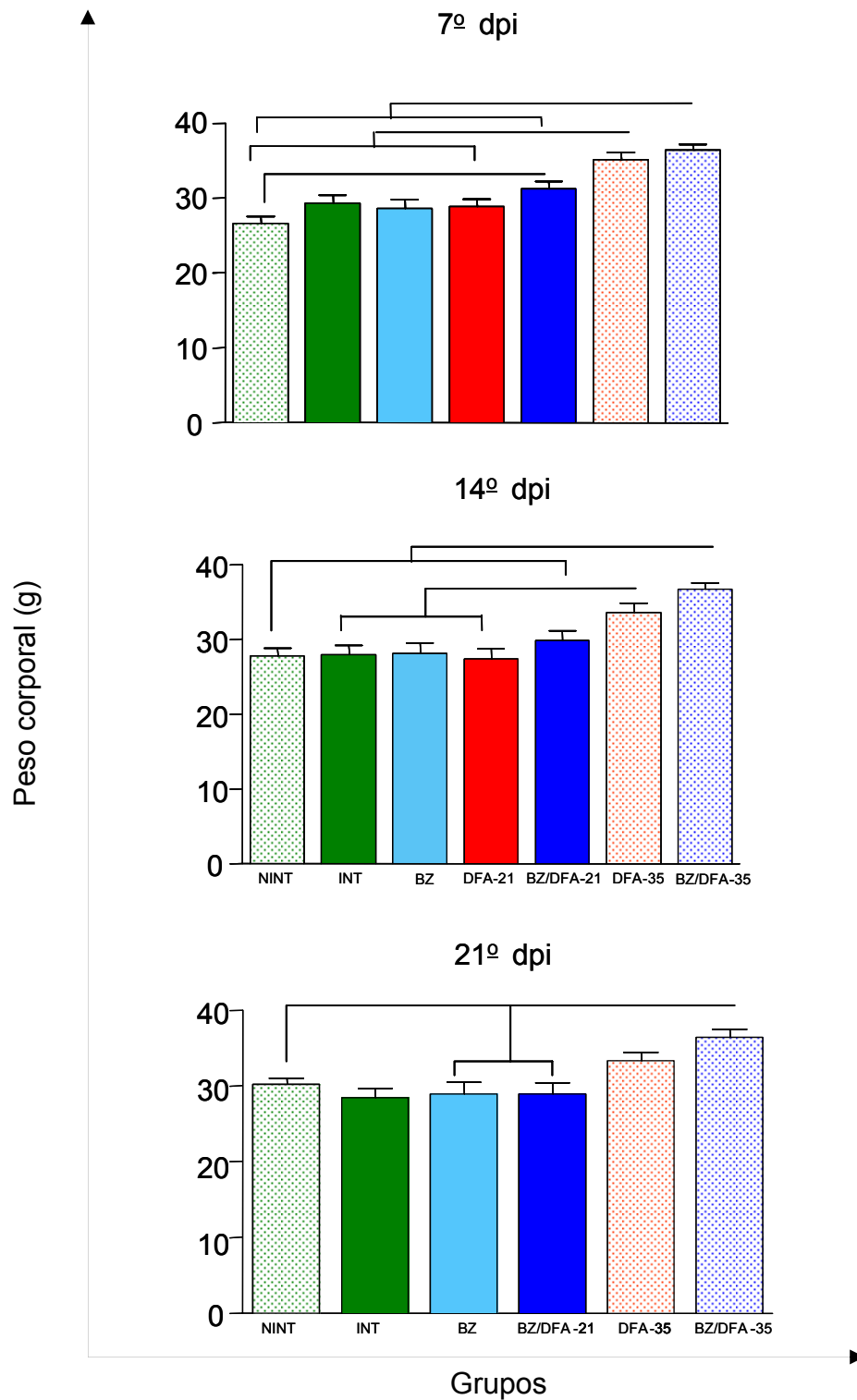


Gráfico 6 - Média do peso corporal dos camundongos Swiss (n=70) infectados com 500 formas tripomastigotas sangüneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* antes da infecção e no 7, 14 e 21 dpi dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas.

4.10 - Peso relativo dos órgãos

O coração, baço, fígado e linfonodo dos animais foram pesados após sacrifício e o peso relativo calculado considerando-se o peso corporal de cada animal e estão representados no Gráfico 7.

Não foram observadas diferenças significativas no peso cardíaco e hepático no 10^o dia. Para o peso relativo do coração no 16^o dia observou-se um aumento significativo no grupo BZ/DFA-35 quando comparado aos grupos BZ e DFA-21.

No fígado observou-se redução significativa no grupo BZ quando comparado aos grupos INT e DFA-21. Um aumento significativo foi observado no grupo DFA-35 em relação aos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21 e BZ/DFA-21 e no grupo BZ/DFA-35 quando comparado ao grupo BZ.

No baço observou-se aumento significativo no peso relativo em todos os grupos quando comparados ao grupo NINT no 10^o dpi. No 16^o observou-se um aumento significativo no peso relativo deste órgão nos grupos INT, DFA-21 e 35 e BZ/DFA-35 quando comparados ao grupo NINT. No grupo BZ observou-se uma redução no peso relativo do baço em relação aos grupos DFA-21 e BZ/DFA-35. Tanto no fígado quanto no baço verificou-se uma redução significativa no peso relativo do 10^o para 16^o dpi no grupo BZ/DFA-21.

No linfonodo foi observado um aumento significativo no peso relativo deste órgão no 10^o e 16^o dpi no grupo DFA-21.

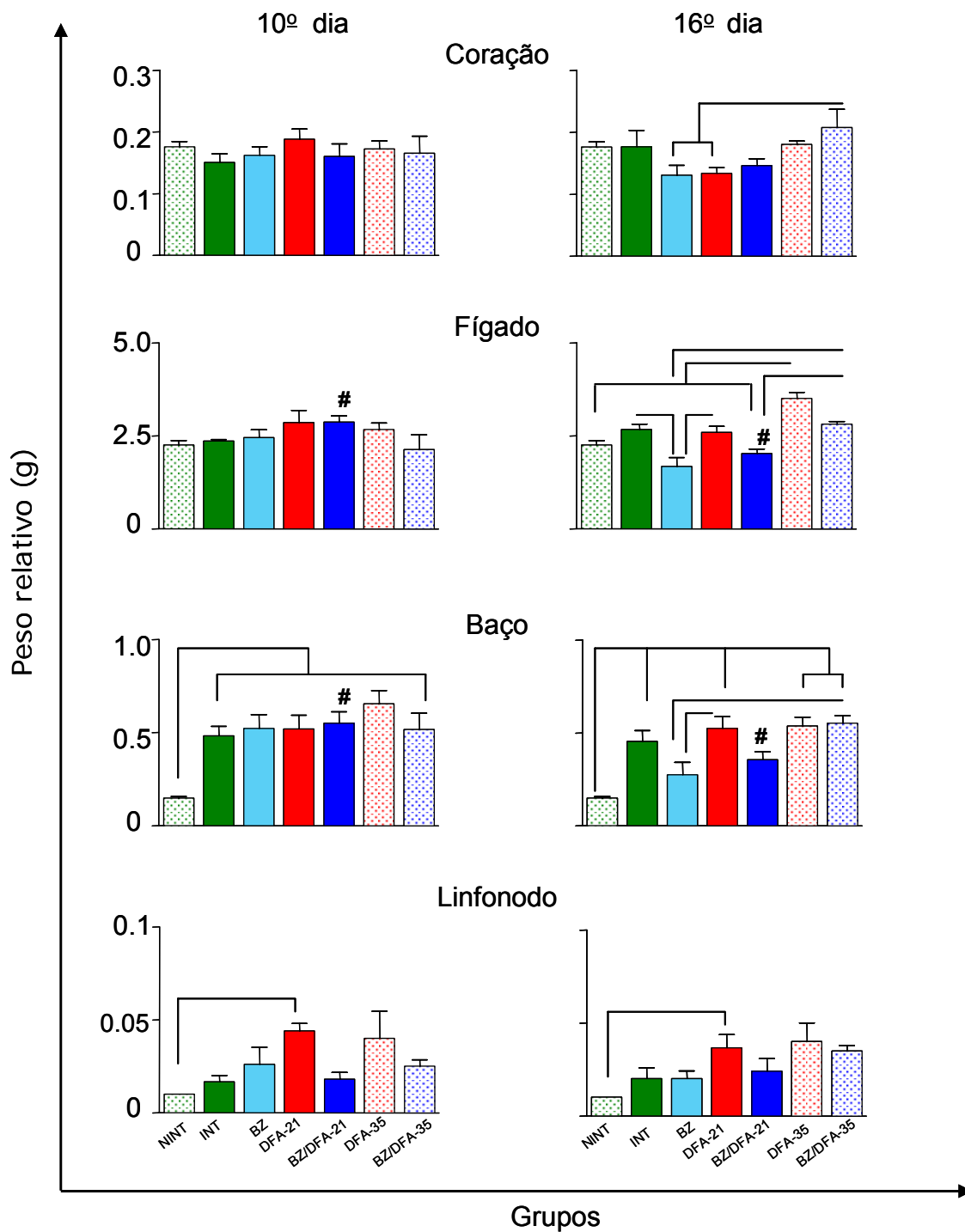


Gráfico 7 - Peso relativo do coração, fígado, baço e linfonodo dos animais no 10º e 16º dia infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas. # indica diferença significativa entre o 10º e 16º dpi.

4.11 - Análise morfométrica do processo inflamatório no coração e fígado

O processo inflamatório cardíaco foi significativamente maior no grupo DFA-35 quando comparado aos grupos NINT, INT, BZ e DFA-21 no 10^o dpi (Gráfico 8 A e Figura 2). O grupo BZ/DFA-35 também apresentou processo inflamatório significativamente maior quando comparado ao grupo NINT.

No 16^o dpi o processo inflamatório foi significativamente maior no grupo INT e BZ/DFA-35 em relação ao grupo NINT (Gráfico 8 B). No grupo BZ observa-se redução significativa do processo inflamatório em relação ao grupo BZ/DFA-35. Também foi observada redução significativa no processo inflamatório entre o 10^o e 16^o dpi no grupo DFA-35.

No 10^o e 16^o dpi o infiltrado inflamatório hepático foi significativamente maior nos grupos INT, BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35 quando comparados aos animais do grupo NINT (Gráfico 8 C e D).

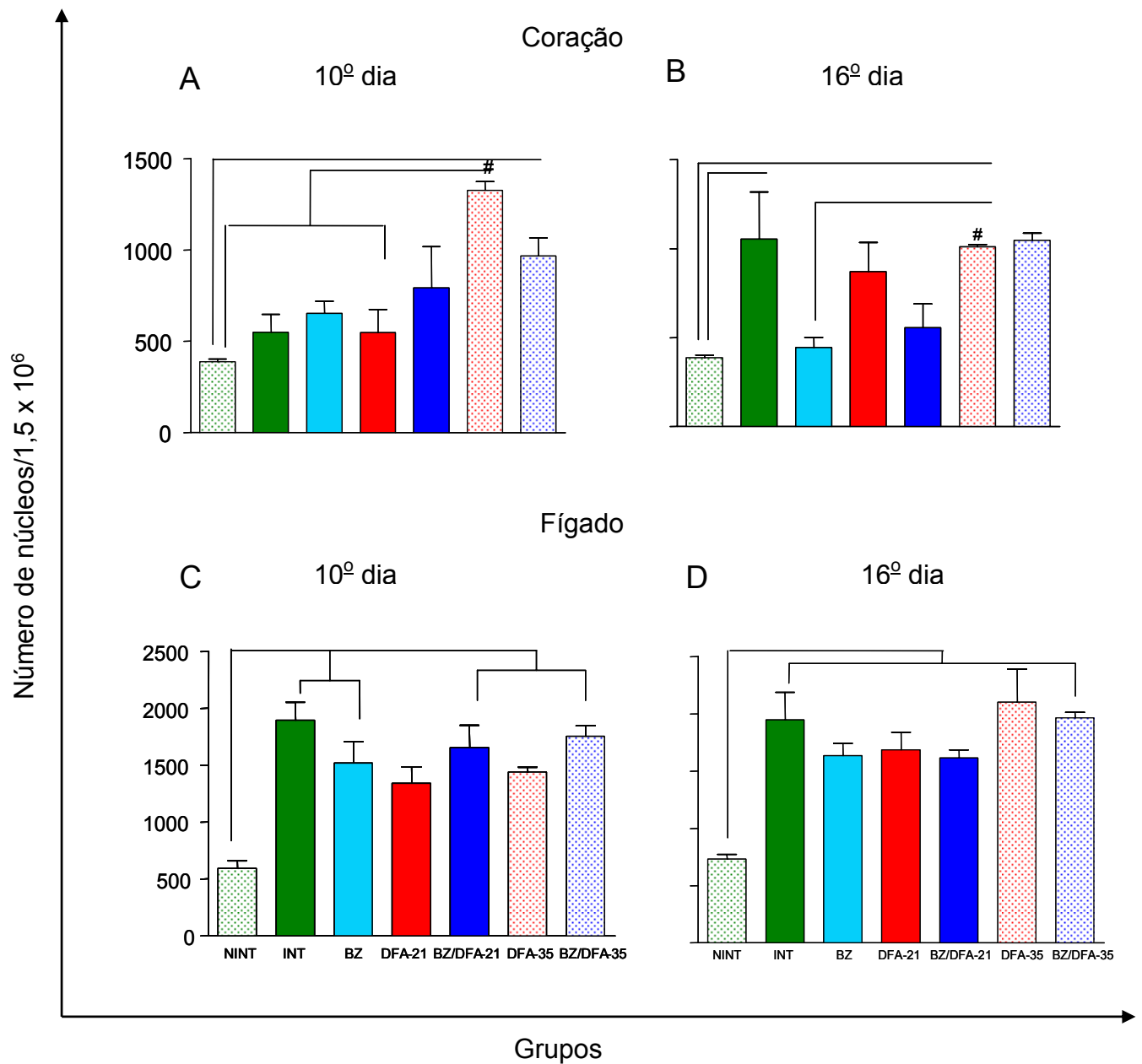


Gráfico 8 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco (A e B) e hepático (C e D) no 10º e 16º dia nos animais (n=70) infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos NINT, INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas. # indica diferença significativa entre o 10º e 16º dpi.

4.12 - Análise morfométrica do parasitismo tecidual

Como não houve diferença em relação ao parasitismo tecidual no 10^o e 16^o dpi, no coração, baço e fígado, os resultados foram expressos conjuntamente. Não foram observados parasitos nos grupos BZ, BZ/DFA-21 e 35 no coração e fígado. Os grupos BZ/DFA-21 e 35 não apresentaram parasitos no baço. No linfonodo não foi observado parasitismo.

O parasitismo cardíaco foi significativamente maior no grupo INT em relação aos grupos DFA-21 e 35 (Gráfico 9). No fígado não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, porém os animais pertencentes aos grupos DFA-21 e 35 apresentaram um menor parasitismo em comparação ao grupo INT. Quanto ao baço, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, porém, o grupo BZ apresentou um menor parasitismo esplênico quando comparado aos demais grupos.

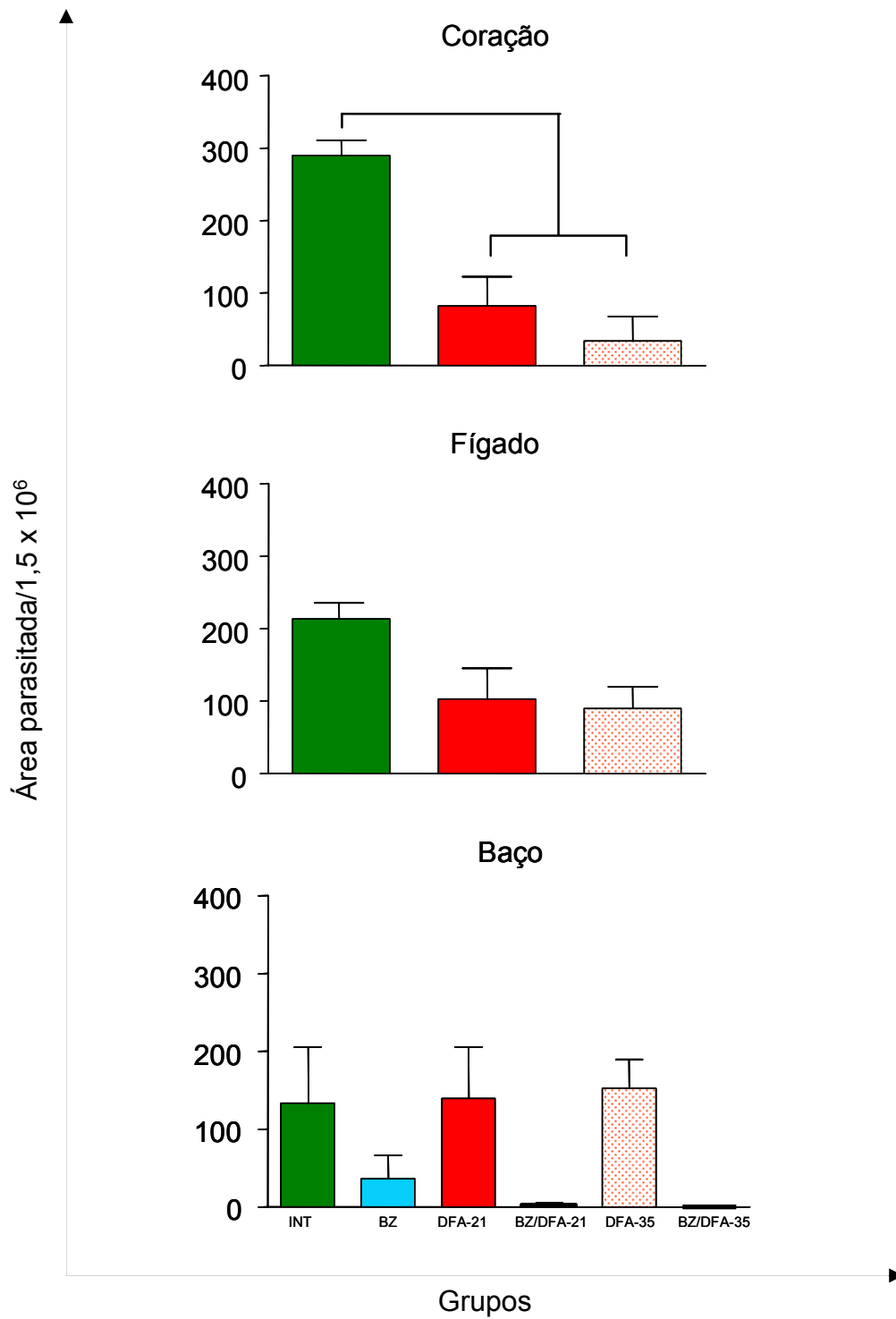


Gráfico 9 - Análise morfométrica do parasitismo tecidual no coração, fígado e baço dos animais (n=70) infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* dos grupos INT, BZ, DFA-21, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35. As linhas indicam diferenças significativas.

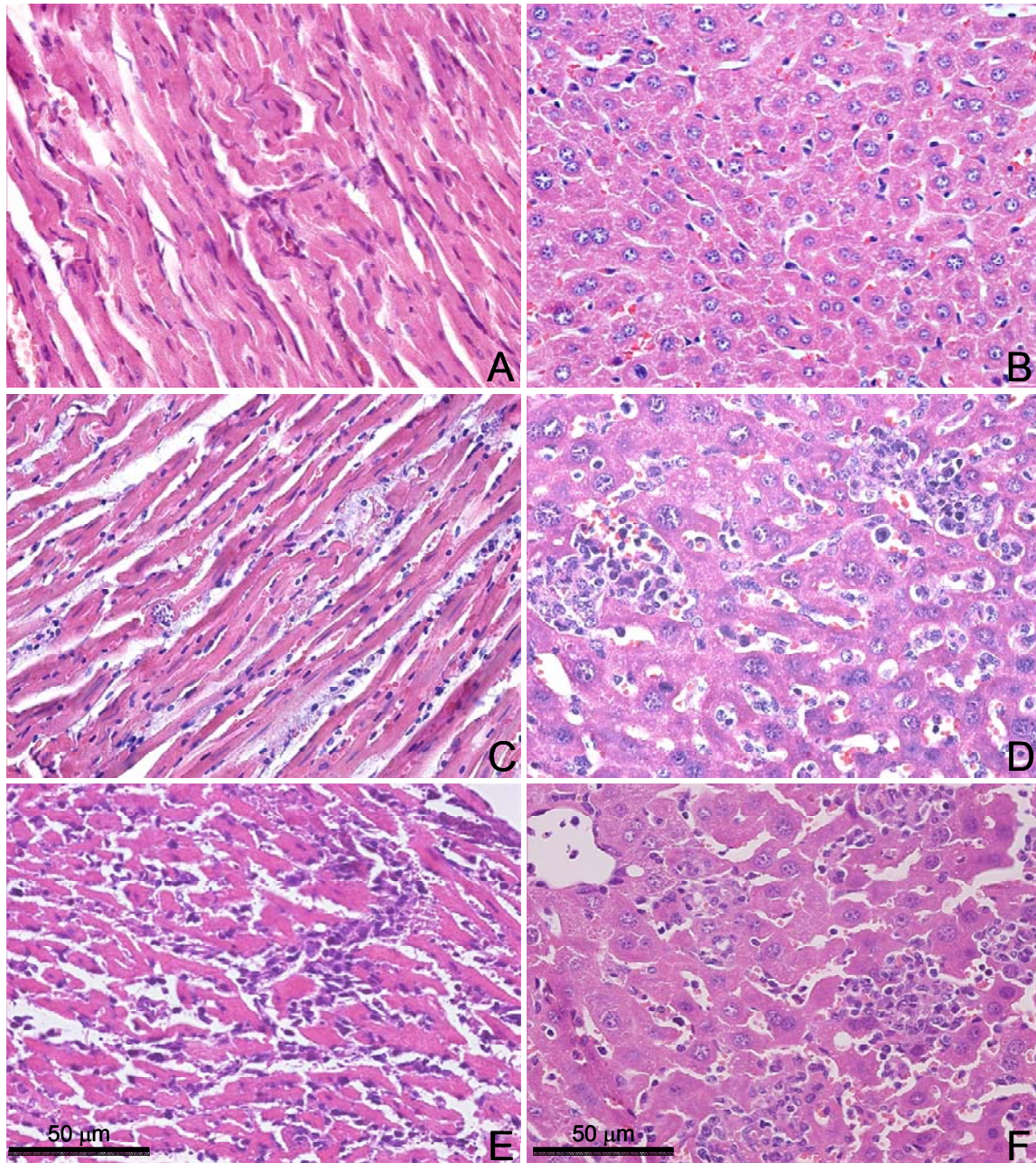


Figura 2 - Fotomicrografias de secções do coração (A, C e E) e fígado (B, D e F) de camundongos não infectados necropsiados no 10 dia. (A) e (B) Grupo controle; (C e D) Grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e (E e F) Grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratado com Desferrioxamina por 35 dias. Ausência de alterações inflamatórias ou degenerativas no grupo controle. Observa-se nos grupos infectados processo inflamatório cardíaco mononuclear, mais exuberante em E. No fígado a intensidade da inflamação foi semelhante entre os dois grupos. Hematoxilina Eosina, X600.

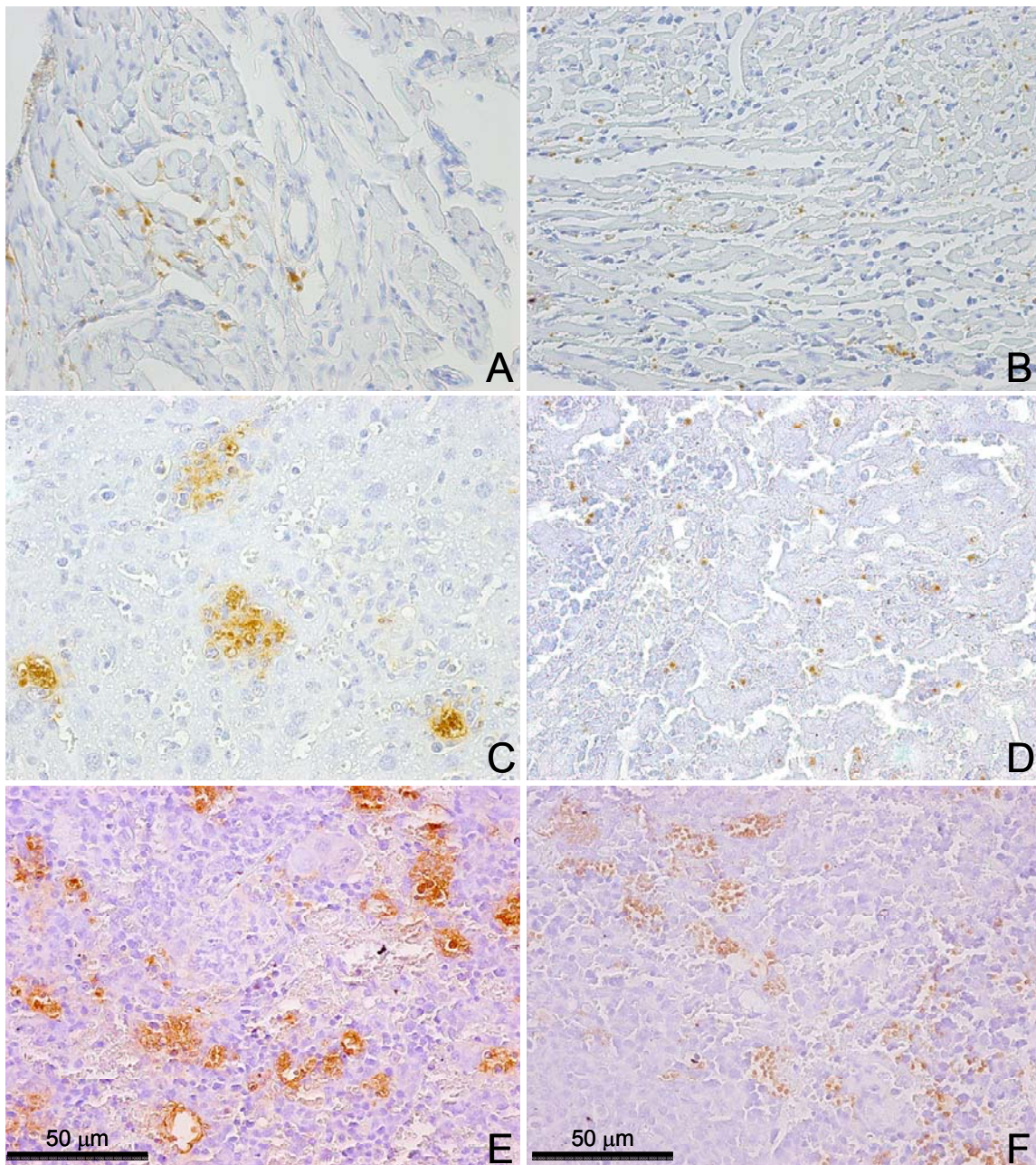


Figura 3 - Fotomicrografias de secções do coração (A e B), fígado (C e D) e baço (E e F) submetidas às reações de imuno-histoquímica para detecção amastigotas do *Trypanosoma cruzi*. (A, C e E) Grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*: coração, fígado e baço apresentando ninhos de amastigotas; (B, D e F) Grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratado com Desferrioxamina por 35 dias: coração e fígado apresentando amastigotas isoladas. Peroxidase Anti-peroxidase X1000.

O ferro é importante na patogênese de muitas doenças. Lima e Villalta (1989) demonstraram que esse mineral é essencial para o crescimento das formas amastigotas do *T. cruzi* e é obtido da transferrina através da endocitose mediada por receptores presentes nessas formas, o que confirma desta maneira que fatores nutricionais também podem influenciar o curso da infecção pelo *T. cruzi*. Estudos iniciais sugeriram que a deficiência de ferro poderia agravar a infecção pelo *T. cruzi* em roedores (Lee *et al.*, 1977) posteriormente Lalonde e Holbein (1984) mostraram que a depleção dos estoques de ferro pelo quelante DFA e uma dieta deficiente em ferro conferiam proteção contra a infecção em camundongos. Recentemente, Arantes *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento com a DFA promove a redução da parasitemia e mortalidade em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

A hipótese considerada neste trabalho é de que o ferro seja importante para a proliferação do parasito e a sua redução possa afetar também, de maneira positiva, o tratamento com Bz. Para testar essa hipótese, foram utilizados diferentes protocolos de tratamento com DFA ou Bz-DFA em comparação aos grupos apenas infectados ou infectados e tratados com Bz.

Um questionamento foi levantado sobre a influência da redução dos estoques de ferro quanto ao período de tratamento pelo quelante, se realmente havia a necessidade do tratamento prévio à infecção como realizado por Arantes *et al.* (2007). Para responder esse questionamento, utilizou-se o protocolo padronizado por Arantes *et al.* (2007) comparativamente a um protocolo de tratamento com a DFA que seguiu em paralelo à infecção. Essa comparação mostrou a redução dos níveis de parasitemia apenas no grupo DFA-35 quando comparado ao grupo INT, mostrando que a gravidade da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* em camundongos foi atenuada pelo tratamento com a DFA apenas quando este se iniciou antes da infecção resultando em uma depleção prévia nos estoques de ferro. Provavelmente, quanto menor a quantidade de ferro disponível no hospedeiro, maior a dificuldade de reprodução do parasito e, conseqüentemente, melhor será o quadro clínico apresentado.

Em trabalhos de Pedrosa *et al.* (1990) a cepa Y do *T. cruzi* não foi sensível a este tipo de tratamento, somente sendo sensível à deficiência de ferro provocada pela dieta sem ferro. Os autores acreditam que isto foi possível devido à multiplicação rápida da cepa Y e ao menor tempo para alcançar o crescimento ótimo, quando comparado à cepa YuYu que foi sensível ao tratamento com DFA. O inóculo utilizado

por aqueles autores (1400 formas tripomastigotas) foi maior que o utilizado neste experimento (500 formas tripomastigotas) e o esquema de tratamento, apenas uma dose de DFA no 5º dpi, difere do utilizado nesse trabalho, o que explica as diferenças observadas entre os dois protocolos experimentais.

Breidbach *et al.* (2002) avaliaram a inibição das formas sangüíneas do *Trypanosoma brucei* pela DFA e observaram que a incubação do parasito com o quelante levou à inibição da síntese de DNA e ao menor consumo de oxigênio, o que indica que a DFA pode afetar a ribonucleotídeo redutase e oxidase. No nosso caso, aparentemente, o efeito *in vivo* da DFA sobre o parasito deve-se à alteração dos estoques de ferro no organismo associado a uma ação direta do mesmo sobre o parasito visto que foi observada diferença entre DFA-21 e DFA-35. Experimentos posteriores possivelmente confirmem esta hipótese.

Nesse trabalho, o tratamento somente com Bz reduziu a parasitemia e o período patente e promoveu uma taxa de sobrevivência 70%, quando comparado ao grupo INT, que apresentou parasitemia mais elevada e taxa de sobrevivência de 0%. A associação do Bz à DFA mostrou no grupo BZ/DFA-21 redução da parasitemia, período patente semelhante e taxa de sobrevivência também de 70%. No grupo BZ/DFA-35 foi observada curva de parasitemia e período patente semelhantes aos do grupo BZ, no entanto, a taxa de sobrevivência foi de 100%. Os níveis de parasitemia também foram menores nos grupos que apresentaram associação BZ/DFA. Esses resultados indicam que a associação BZ/DFA promove redução na parasitemia e aumento na sobrevivência. Nos grupos tratados apenas com a DFA não houve diferença no grupo DFA-21 e no grupo DFA-35 verificou-se redução da parasitemia e 30% de sobrevivência.

Filardi e Brener (1987) e Toledo *et al.* (1997) descreveram a existência de cepas naturalmente resistentes e susceptíveis ao Bz. A resistência natural aos nitro-derivados tem sido sugerida como um importante fator para explicar as baixas taxas de cura detectadas em pacientes tratados (Murta e Romanha, 1998).

Dados da literatura indicam uma variedade de mais de 100 diferentes cepas do *T. cruzi*, obtidas de várias fontes e regiões geográficas, que possuem diferentes graus de susceptibilidade ao Bz. Essas cepas foram classificadas como “susceptíveis” quando a taxa de cura variou de 67 a 100%, “parcialmente susceptíveis” quando variou de 34 a 66% e “resistentes” quando os animais infectados apresentam taxas de cura de 0 a 33% (Toledo *et al.*, 2004).

Durante o tratamento, Murta *et al.* (1999) mostraram que a administração do Bz, aumentou a fagocitose, destruição do parasito e liberação de citocinas (IL-12, TNF- α , IFN- γ e NO) por macrófagos de camundongos infectados por clones naturalmente susceptíveis (BZR) ao *T. cruzi* (cepa Y). Esses estudos implicam o envolvimento do sistema imune na eficácia do tratamento da infecção pelo parasito o que sugere a existência de uma cooperação do fármaco com a resposta imune contra o parasito, o que assegura a eficácia quimioterápica. Interessantemente, este efeito cooperativo é observado em uma população de *T. cruzi* susceptível ao tratamento, ao contrário da população resistente, e pode explicar, em parte, o mecanismo pelo qual o parasito pode resistir à quimioterapia *in vivo* (Murta *et al.*, 1999). Em contrapartida, Revelli *et al.*, no mesmo ano, observaram que o tratamento com Bz diminui a produção de NO.

A terapia com Bz possui 100% de eficácia em camundongos infectados pelo *T. cruzi* "nocautes" em IL-4 e é menos eficaz para camundongos nocautes em IFN- γ (0%), IL-12 (58%), TNF- α (65%) e iNOS (72%) (Romanha *et al.*, 2002). Em humanos, foi demonstrado que pacientes portadores da DC tratados com Bz e curados apresentaram mais IFN- γ do que pacientes tratados e não curados (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000).

Considerando a taxa global de sobrevivência à fase aguda nos diferentes grupos, verificou-se percentual de 65% (52 camundongos em 80). Constatou-se que em cada grupo a taxa de sobrevivência atingiu 85% (BZ e BZ/DFA-35), 60% (BZ/DFA-21) e 30% (DFA-35). Com o objetivo de avaliar o índice de cura nestes animais, coletou-se sangue na fase aguda (60) e crônica (120 e 240) da infecção para a realização dos exames parasitológicos (hemocultura e PCR) e sorológico (ELISA).

A hemocultura apresenta alta especificidade, mas a sensibilidade dessa técnica é baixa, mesmo no modelo murino, dependendo do estoque de *T. cruzi* considerado (Martins *et al.*, submetido) e devido a esse fato deve ser associada a outros métodos no controle de cura dos animais.

Recentemente, técnicas moleculares, como a PCR vêm sendo cada vez mais usadas apresentando uma excelente capacidade de detecção da infecção no modelo murino independente do estoque de *T. cruzi* (Miyamoto *et al.*, 2006) e também para o controle de cura após tratamento (Martins *et al.*, submetido).

Entretanto, as técnicas sorológicas embora sejam métodos de fácil execução, simplicidade, baixo custo e excelente desempenho na detecção da infecção para o controle de cura ela apresentam-se limitadas devido à demora na negativação mesmo

após indício de sucesso terapêutico (Andrade *et al.*, 1992).

Neste trabalho, 41, 58, 83 e 47% dos animais dos grupos BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35, respectivamente, apresentaram hemocultura negativa na fase aguda da infecção. A PCR realizada aos 60 dpi mostrou 24, 58, 67 e 35% de negatividade para os grupos BZ, BZ/DFA-21, DFA-35 e BZ/DFA-35, respectivamente. Por outro lado, na sorologia realizada as 240 dpi, apenas 12% e 17% dos animais dos grupos BZ e DFA-35, respectivamente, mostraram resultados de ELISA negativos. Considerando a eficiência da PCR associada à hemocultura no controle de cura no modelo murino e demora na negativação da ELISA após a cura, é provável que a taxa de cura nos animais seja superior (18% grupo BZ e BZ/DFA-35, 42% para o grupo BZ/DFA-21 e 67% para o grupo DFA-35) ao compararem-se os três critérios de cura associados. Esses resultados sugerem que a alteração dos estoques de ferro altera o curso da infecção, favorecendo a cura parasitológica.

Dos 52 animais infectados e tratados com DFA e/ou Bz que sobreviveram à fase aguda da infecção, um animal do grupo BZ apresentou PCR e ELISA negativos na fase crônica da infecção, sugerindo que o mesmo tenha se curado frente à utilização deste fármaco. Um dos possíveis mecanismos de eficácia do Bz poderá ter sido na inibição da síntese de DNA do parasito. Os animais do grupo BZ/DFA-35 apesar de não apresentarem cura parasitológica, de acordo com os critérios utilizados, tiveram 100% de sobrevivência o que indica uma melhor capacidade destes em lidarem com a infecção pelo *T. cruzi*.

Em relação à infecção pelo *T. cruzi* já está bem estabelecido que a resposta protetora depende da imunidade inata e adquirida, requerendo a participação de macrófagos, células NK, linfócitos B e T e produção de diferentes citocinas, que possuem importantes papéis na regulação da replicação do parasito e da resposta imune (Tarleton, 2003; Silva *et al.*, 2003). A fase aguda da infecção é caracterizada pela ativação de macrófagos e produção de citocinas inflamatórias, especialmente TNF- α e IL-12 (Silva *et al.*, 1995; Aliberti, 1996), que ativam a produção de IFN- γ por células NK (Cardillo, 1995). O IFN- γ é crucial para a defesa contra o parasito e sua combinação com TNF- α leva à síntese da enzima iNOS por macrófagos, o que resulta na produção de NO (Vespa *et al.*, 1994), que por sua vez, controla a replicação do *T. cruzi* (Vespa *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2001).

Dada a importância do NO contra a proliferação do *T. cruzi*, pode-se especular

que uma das ações da DFA poderá ter sido o aumento da síntese de NO no hospedeiro, além da diminuição do ferro, que controla a replicação do parasito, o que resulta também em uma das hipóteses da diminuição de parasitos circulantes nos animais infectados e tratados em relação aos animais infectados. Camundongos Swiss são susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* e apresentam modesta indução de iNOS frente a infecção, em relação a camundongos C57BL6 que são resistentes ao *T. cruzi* e respondem à infecção com uma forte indução do gene iNOS em fagócitos (Malvezi *et al.*, 2004). Portanto, a DFA pode ter favorecido maior resistência ao hospedeiro atuando de duas formas: 1- reduzindo a oferta de ferro para o parasito e 2- ampliando a produção de NO pelo hospedeiro, ambas, favorecendo a eliminação do parasito. Estas duas hipóteses deverão ser confirmadas em novos experimentos a serem realizados em camundongos isogênicos.

Ressalta-se que independente do tratamento com a DFA, todos os animais infectados, tratados ou não com BZ, apresentaram redução significativa na concentração de ferro hepático no 10^o e 16^o dia em relação ao grupo NINT semelhante ao observado por outros autores para animais apenas infectados e infectados e tratados com a DFA (Pedrosa *et al.*, 1990; Arantes *et al.*, 2007). Esses resultados mostram que apenas a infecção pelo *T. cruzi* já promove a redução da concentração de ferro hepático sugerindo que o parasito deva interferir neste metabolismo.

O tratamento com DFA não alterou os níveis de ferro no fígado e baço em camundongos convencionais e *germfrees* no 15^o dia após infecção pelo *T. cruzi* (Pedrosa *et al.*, 1993). Lalonde e Holbein (1984) apenas verificaram redução nos estoques de ferro do organismo (48% no fígado e 15% no baço) de animais não infectados quando associaram o tratamento com DFA e uma dieta deficiente em ferro.

Dallman *et al.* (1986) demonstraram que a deficiência de ferro no organismo acontece em três estágios, com sobreposição destes. O primeiro estágio é caracterizado pela diminuição na concentração de ferritina sérica que reflete perda nos estoques de ferro no baço, fígado e medula óssea. O segundo estágio é caracterizado por um aumento na capacidade de ligação de ferro e diminuição da concentração de ferro sérico. No último estágio, as concentrações de hemoglobina e hematócrito diminuem, e os estoques de ferro no baço e fígado tornam-se bastante exauridos.

A hepcidina é um hormônio produzido pelo fígado, secretado na circulação, envolvido na regulação de ferro no organismo, que atua na diminuição da absorção pelos enterócitos e na posterior liberação de ferro dos macrófagos e hepatócitos. Este

hormônio contribui para a diminuição da absorção de ferro intestinal na presença de processos inflamatórios que favorece a anemia associada à inflamação (Fleming e Bacon, 2005).

No presente trabalho, a liberação de hepcidina pelo fígado poderia explicar a diminuição de ferro tecidual encontrada nos animais infectados (tratados ou não). Provavelmente esta liberação causou redução na absorção de ferro pelos enterócitos e, conseqüentemente, o seu transporte para o fígado. Aliado a isto, a diminuição do ferro pode ser explicada pela infecção pelo *T. cruzi*, na própria necessidade do parasito em adquirir ferro para seu metabolismo.

A dosagem do ferro sérico, no 10^o dia, mostrou maior concentração nos animais do grupo BZ/DFA-35 em relação aos grupos INT e BZ. Esse resultado era esperado uma vez que o ferro quelado passa pela corrente sangüínea antes de ser eliminado, o que sugere que o tratamento com o quelante por 35 dias foi eficiente. No 16^o dia observou-se diferença significativa entre os animais dos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35 em relação aos demais, indicando que a associação BZ/DFA-35 promoveu uma maior quelação. Os valores observados no grupo BZ/DFA-35 no 16^o são maiores que o observado no 10^o dpi permitindo aludir que quanto maior o período de tratamento com a DFA, maior a quantidade de ferro eliminada do organismo. Os níveis de ferro sérico maiores no grupo BZ/DFA-35 em relação ao grupo DFA-35 sugerem uma ação conjunta do BZ associado à DFA, potencializando a quelação.

Lalonde e Holbein (1984) mostraram que camundongos não infectados pelo *T. cruzi* e tratados com DFA não apresentaram mudanças significativas nos níveis de ferro sérico, enquanto os animais infectados e tratados apresentaram suficientes estoques de ferro para manterem uma resposta imune normal.

Como observaram Bothwell *et al.* (1979), o primeiro *pool* de ferro no sangue do hospedeiro vertebrado é constituído pelo ferro associado à hemoglobina. A dosagem da hemoglobina é importante para se correlacionar à deficiência férrica do hospedeiro quando submetido a deficientes dietas, infecções ou algum tipo de tratamento que acarrete alterações nos níveis de ferro.

Alterações nos níveis de hemoglobina foram descritas em várias infecções por tripanosomas (Esievo *et al.*, 1982; Igbokwe e Anosa, 1989). Estas alterações foram observadas na infecção pelo *T. cruzi*, por redução no número de plaquetas (Cardoso e Brener, 1980; Ruiz *et al.*, 1989), no número de eritrócitos (Cardoso e Brener, 1980) e no valor do hematócrito (Lalonde e Holbein, 1984).

Marcondes *et al.* (2000) ressaltaram que a infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* está associada à anemia, trombocitopenia, leucopenia e hipoplasia da medula óssea. Contudo, os mecanismos responsáveis por estas alterações hematológicas não são bem entendidos.

Pedrosa *et al.* (1990) avaliaram a deficiência de ferro e correlacionaram os efeitos desta deficiência à evolução da DC. Os autores mostraram que a hipohemoglobinemia apresentada pelo hospedeiro foi permanente no grupo de camundongos alimentados com dieta sem ferro, provavelmente porque os baixos estoques de ferro não foram suficientes para compensar a eritropoiese que segue a anemia. Nos animais tratados com DFA houve recuperação dos níveis de hemoglobina quando infectados com as cepas CL e Y, o que sugere a não interferência desse tratamento nas necessidades adequadas para a eritropoiese.

A dosagem de hemoglobina realizada antes da infecção (dia 0) e aos 7 e 21 dpi, não mostrou diferença na sua concentração. Arantes *et al.* (2007) observaram redução na concentração de hemoglobina apenas entre os animais não infectados tratados em relação aos infectados e tratados. Após a infecção, era esperada redução nas concentrações de hemoglobina nos animais infectados em relação aos animais não infectados, o que não ocorreu em nenhum momento. Provavelmente isto está relacionado à resposta do hospedeiro frente à infecção. Letendre (1985) mostrou que a gênese da anemia apresentada pelo hospedeiro pode estar relacionada à resposta hipoferrêmica. Durante as infecções há redução nos níveis de ferro circulante devido à diminuição da liberação do ferro do sistema fagocitário mononuclear, o que dificultaria sua utilização na formação de hemoglobina. No 14^o dpi os animais do grupo DFA-35 apresentaram redução na concentração de hemoglobina em relação ao grupo BZ/DFA-21.

No 14^o dpi os animais do grupo BZ/DFA-35 apresentaram maiores níveis de hemoglobina em relação aos demais provavelmente porque não haviam sido exauridos os estoques de ferro do organismo. Dessa maneira, não aconteceu um comprometimento do ciclo interno do ferro, sendo ainda possível a ocorrência de sua reciclagem no organismo. Outra explicação possível é que a DFA não remove o ferro da transferrina, da hemoglobina ou de outras substâncias contendo grupo heme. Em decorrência de suas propriedades como agente quelante ele é somente capaz de deslocar o ferro que se encontra tanto no plasma quanto nas células na forma livre, dando origem ao complexo ferrioxamina.

O tratamento com DFA pode acarretar redução significativa no peso corporal dos animais controles tratados com DFA em relação aos animais controles não tratados como demonstrado por Hershko e Peto (1988). Arantes *et al.* (2007) utilizaram o mesmo protocolo de tratamento e observaram diminuição no peso corporal dos animais infectados e tratados com a DFA por 35 dias.

De maneira geral verificou-se o aumento do peso corporal nos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35 nos tempos avaliados. Provavelmente o aumento do peso corporal dos animais tratados com DFA por 35 dias se deva ao aumento no peso relativo do coração, fígado e baço. A comparação do grupo infectado ao controle mostrou que a infecção pelo *T. cruzi* não provocou redução do peso dos animais. Carlomagno *et al.* (1987) demonstraram que o ganho de peso, os níveis de proteínas e albumina no soro dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*, não diferiram em comparação aos animais controles, o que comprovou a infecção não conduziu à perda de peso.

Nesse trabalho, os órgãos analisados são importantes para o entendimento das lesões provocadas pelo *T. cruzi* e dos processos decorrentes dos diferentes tratamentos empregados nessa experimentação. Apesar dos mecanismos envolvidos na patogênese de órgãos alvos do *T. cruzi* não serem elucidados completamente, a persistência do parasito e os eventos auto-ímmunes têm sido apontados como fundamentais na formação das lesões teciduais (Zhang e Tarleton, 1999).

No curso destes processos, o surgimento de alterações nos órgãos e tecidos está relacionado também ao tropismo da cepa e, conseqüentemente, ao maior parasitismo dos diferentes setores do organismo (Andrade *et al.*, 1970; Andrade, 1974).

No 10^o dia não foram observadas diferenças significativas nos pesos relativos do coração entre os grupos apesar dos animais do grupo DFA-35 e BZ/DFA-35 apresentarem um aumento no processo inflamatório. A inflamação do miocárdio é de extrema importância em todo o processo patológico da doença, devido à maneira como as reações ao parasito se desenvolveram neste órgão. No 16^o dia o peso relativo do coração dos animais do grupo BZ/DFA-35 foi maior em relação aos grupos BZ e DFA-21 já o processo inflamatório foi menor no grupo BZ e maior nos animais dos grupos INT e BZ/DFA-35. O maior processo inflamatório no 10^o dia pode ser responsável pelo aumento no peso relativo do coração no grupo BZ/DFA-35 no 16^o dia.

Arantes *et al.* (2007) observaram que baço, fígado e linfonodo dos animais do grupo infectado não tratado e infectado tratado com DFA apresentaram aumento de peso em relação aos seus respectivos controles bem como em relação ao grupo

infectado. Não foram observadas diferenças em relação ao parasitismo tecidual avaliado no coração, baço, fígado e linfonodo dos animais infectados, tratados ou não com DFA.

A forma aguda da doença representa uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, pois suas formas amastigotas podem ser encontradas nas secções histológicas de quase todos os órgãos e no interior de vários tipos celulares, usualmente com a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, congestão aguda e edema. Segundo Guarner *et al.* (2001) durante a fase aguda da infecção em camundongos DBA/2 infectados com 2×10^4 tripomastigotas da cepa Brasil do *T. cruzi*, o parasito foi visto dentro dos miócitos (coração, músculo esquelético, esôfago e estômago), histiócitos (do fígado, linfonodo e baço), células acinares (no pâncreas), astrócitos e células endoteliais (as duas últimas no sistema nervoso central). As formas amastigotas estavam presentes intracelularmente em ninhos (pseudocistos); usualmente sem inflamação presente ao redor dos mesmos. Ocasionalmente, amastigotas isoladas foram observadas extracelularmente, cercadas por infiltrado inflamatório mononuclear.

A inflamação é o processo patológico básico nos tecidos afetados, com a presença de células inflamatórias, que incluem macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células T (Villata e Kierszenbaum, 1983; 1984a). Adicionalmente, o tratamento com Bz parece estar diretamente correlacionado à menor resposta inflamatória no coração, com redução nas quantidades dos componentes da matriz extracelular depositados ocorrendo concomitantemente um pequeno infiltrado inflamatório no miocárdio de camundongos infectados e tratados com Bz. Células T CD4⁺ e moléculas MHC de classe II, mas não células T CD8⁺, estão envolvidas no controle de crescimento do parasito no coração. A ação anti-parasitária destas células neste órgão é realizada de uma maneira sinérgica. A baixa ou ausente atividade anti-parasito mediada por células T CD8⁺ no tecido cardíaco pode ser explicada pela ausência de expressão de antígenos MHC de classe I nos miócitos (Russo *et al.*, 1996).

A resposta inflamatória cardíaca pode ser intensificada, particularmente devido à produção de níveis elevados de IFN- γ por células T CD8⁺. De fato, pacientes com alterações cardíacas produzem mais IFN- γ do que indivíduos na fase indeterminada da doença, o que indica um possível papel desta citocina na fisiopatologia da DC. Outra possibilidade seria a de que a expansão de células T CD8⁺ participe ativamente do controle do parasitismo tecidual. Estudos anteriores demonstraram que a ausência de linfócitos T CD8⁺ leva a altos níveis de parasitemia e parasitismo tecidual, e foi

sugerido que este alto grau de susceptibilidade está relacionado a baixos níveis de IFN- γ (Russo *et al.*, 1996).

Na fase aguda da DC a rápida indução de citocinas anti-inflamatórias nos cardiomiócitos após a infecção pelo *T. cruzi* pode exercer um efeito protetor no miocárdio contra os efeitos prejudiciais da inflamação. Portanto, os cardiomiócitos assumem um importante papel na sobrevida, onde os mesmos respondem rapidamente à presença de patógenos ou produtos dos mesmos por estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias através da ligação via receptores *Tolllike* (Petersen *et al.*, 2005).

No coração observou-se redução significativa no parasitismo tecidual do coração para os grupos DFA-21 e 35 quando comparados ao grupo INT. Ribeiro dos Santos *et al.* (1991) observaram no modelo murino, que as lesões difusas do miocárdio e as lesões de fibras cardíacas não-parasitadas estão ligadas aos mecanismos de imunidade celular desde a fase aguda da doença. Como demonstrado por Grimaud e Andrade (1984), a integridade das miocélulas é mantida mesmo na presença do ninho parasitário, mas a partir do momento que as formas parasitárias começam a se desintegrar as alterações nestas células têm início, levam à necrose e induzem o aparecimento do infiltrado inflamatório. A determinação da inflamação aguda é também confirmada por Silva *et al.* (1985), segundo os autores, a inflamação é devido à formação de um complexo antígeno-anticorpo, a partir da liberação de produtos antigênicos do parasito no interstício.

O fígado é o principal órgão metabólico do corpo e os hepatócitos têm a função de detoxificação e de metabolização de muitas substâncias exógenas (Olivieri *et al.*, 2002). Além disso, a cepa Y tem seu tropismo direcionado ao baço, fígado e medula óssea. Não foram observadas diferenças no peso relativo hepático no 10^o dia para todos os grupos. No 16^o dia os animais do grupo DFA-35 apresentaram um aumento no fígado em relação aos demais grupos exceto para o grupo BZ/DFA-35. Os grupos BZ e BZ/DFA-21 mostraram uma redução no peso relativo hepático.

Com relação ao processo inflamatório hepático foi observado aumento significativo deste no 10^o para os grupos INT, BZ, BZ/DFA-21 e 35 e DFA-35 em relação ao grupo NINT. No 16^o dia o processo inflamatório foi significativamente maior em todos os grupos quando comparados ao grupo NINT. Esta inflamação talvez possa ser explicada devido à produção de alguma citocina que pode atrair leucócitos para o local de inflamação na tentativa de controlar a replicação intracelular do parasito.

No fígado não foram observadas diferenças significativas para os grupos DFA-21 e 35 em relação ao grupo INT apesar da redução no número de parasitos neste órgão observado pela técnica de IMH. No grupo BZ/DFA-21 observou-se uma diminuição no peso relativo hepático do 10^o para o 16^o dia.

O baço e o linfonodo são órgãos importantes na resposta imune e remoção do *T. cruzi*, sendo ao mesmo tempo alvo e componente ativo de resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Olivieri *et al.*, 2002). No baço observou-se no 10^o dia aumento de peso relativo em todos os grupos quando comparados aos animais do grupo NINT. O aumento esplênico que foi observado no 10^o dia para os animais tratados com Bz o mesmo não foi constatado no 16^o dia, o que levou a crer que a administração deste fármaco por um maior período de tempo foi capaz de prevenir intensa esplenomegalia devido ao controle da expansão dos parasitos. No grupo BZ/DFA-21 observou-se diminuição de peso relativo deste órgão do 10^o para o 16^o dia.

O baço apresentou maior reatividade (hiperplasia e hipertrofia de polpa branca) em todos os grupos quando comparados ao grupo NINT, compatível com resposta mais precoce nesse grupo e eventual proteção, resultados compatíveis com os encontrados por Arantes *et al.* 2007.

O Bz reduz o parasitismo e pode eliminar os sintomas agudos da infecção, abreviando seu curso. Olivieri *et al.* (2002) mostraram que camundongos Swiss infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados com Bz, apresentaram no 9 dpi aumento no peso relativo do baço acompanhado pelo aumento no número de células esplênicas e do linfonodo. No 14 dpi o tratamento com Bz não reverteu o aumento do número de células esplênicas em camundongos infectados e tratados, como observado nos animais infectados e não tratados. Além disso, os camundongos tratados mantiveram não somente a esplenomegalia, mas também um número elevado de células. Este aumento sugere que a elevação gradativa da parasitemia é crucial para promover a esplenomegalia.

Segundo Olivieri *et al.* (2002) nos animais somente infectados e nos infectados e tratados ocorre aumento no número de células T esplênicas. Interessantemente, nos animais infectados e tratados ocorreu expansão preferencial de esplenócitos CD8⁺ comparados ao número de esplenócitos CD8⁺ nos animais infectados e não tratados.

Lima *et al.* (2001) demonstraram que camundongos infectados com uma cepa macrofagotrópica do *T. cruzi* desenvolvem esplenomegalia devido à hiperplasia reativa com quantidades aumentadas de linfócitos e macrófagos, o que culmina em

desintegração do parasito e necrose de células parasitadas. A necrose vem sendo atribuída à liberação de citocinas tóxicas, incluindo TNF- α , de macrófagos parasitados. As lesões necróticas apresentaram-se mais intensas em camundongos susceptíveis (C3H e Swiss) do que em camundongos resistentes (DBA).

No linfonodo observou-se aumento significativo no peso relativo apenas no grupo DFA-21 em relação ao grupo NINT tanto no 10^o quanto no 16^o dia. O tratamento com Bz não causou este aumento. Apesar da ausência de diferença significativa o grupo DFA-35 apresentou maior peso relativo do linfonodo nos dois períodos avaliados. Isto foi observado apenas nos animais tratados com a DFA o que pode indicar aumento da resposta imune frente à infecção. Não foram observados parasitos neste órgão.

Experimentos em camundongos (Alden *et al.*, 1987) e autópsias de crianças desnutridas mostraram que o coração sofre hipotrofia proporcional ao grau de perda de peso (Webb *et al.*, 1986 e Freeman *et al.*, 1994). Herschko e Peto (1988), quando avaliaram os efeitos da DFA em ratos infectados por malária, mostraram que houve um ganho de peso no baço de animais infectados pelo *Plasmodium berghei*. Por outro lado durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, a esplenomegalia e linfadenopatia relacionadas à ativação policlonal de células B e T, são características marcantes (Minoprio *et al.*, 1986a; Minoprio *et al.*, 1986b).

Os processos patogênicos na fase aguda da infecção são complexos e nele estão envolvidos o parasito, sua multiplicação, morte intracelular e os mecanismos imunológicos, com as respostas humoral e celular, que levam às lesões características dessa fase.

A partir de várias indicações sobre a importância do ferro no desenvolvimento da DC, pode ser observado que alterações em seus níveis podem não só mudar o curso da infecção, mas juntamente com o agente patogênico, alterar a integridade dos diversos tecidos e órgãos afetados.

Os resultados aqui obtidos permitem sugerir que a relação parasito-hospedeiro foi mais equilibrada no grupo BZ/DFA-35 onde se observou sobrevida de 100%. Entretanto, esta taxa de sobrevida elevada não foi diretamente relacionada à maior negatização dos critérios parasitológicos de cura. Contudo, no grupo DFA-35 a sobrevida foi baixa (30%), porém, 83% dos animais que sobreviveram apresentaram testes parasitológicos negativos sugerindo cura. Estes dados permitem hipotetizar que a associação DFA/Bz induz modulação positiva da resposta imune. Esta hipótese deverá ser confirmada em experimentos futuros.

O tratamento com Bz reduziu os níveis de parasitemia, sendo esta redução maior nos grupos BZ/DFA (21 ou 35 dias).

O tratamento com Bz reduziu a taxa de mortalidade sendo a associação dos fármacos responsável por 100% de sobrevida no grupo BZ/DFA-35.

Os percentuais de hemocultura e PCR negativos foram maiores nos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35.

A avaliação do *status* de ferro mostrou redução da concentração de ferro hepático frente à infecção, aumento do ferro sérico e hemoglobina no grupo BZ/DFA-35 e aumento no ferro sérico acompanhado pela redução da hemoglobina no grupo DFA-35.

O tratamento com Bz eliminou o parasito do coração e fígado, independente da associação com a DFA; porém, no baço a redução do parasitismo foi mais evidente nos grupos onde foram associados BZ e DFA.

O processo inflamatório cardíaco foi maior no grupo DFA-35 e não foram observadas diferenças no processo inflamatório hepático nos diferentes grupos avaliados.

Os animais infectados e tratados com DFA e BZ por 35 dias apresentaram ganho de peso em relação aos demais grupos o que pode ser reflexo do aumento do peso cardíaco, hepático e esplênico. Estes aspectos poderiam também justificar as taxas de sobrevida e negatificação da Hemocultura e PCR maiores nestes grupos.

Perspectivas futuras:

- ❖ Avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório (quantificação de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺ e neutrófilos);
- ❖ Avaliação da modulação dos quelantes de ferro sobre a resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi*;
- ❖ Avaliação de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10);
- ❖ Expressão da iNOS nos tecidos avaliados.

- Alcântara, A. e Brener, Z. (1978). The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop* 35: 209-219.
- Alden, P.B.; Madoff, R.D.; Stahl, T.J.; Lakatua, D.J.; Ring, W.S.; Cerra, F.B. (1987). Left ventricular function in malnutrition. *Am J Physiol* 7: 353-380.
- Aliberti, J.C.S.; Cardoso, M.A.A.G.; Martins, G.A.; Gazzineli, R.T.; Vieira, L.Q. e Silva, J.S. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-1967.
- Amato Neto, V. (1986). Tratamento da Doença de Chagas. *Rev Med* 64: 10-14.
- Ambrosio, G.; Zweier, J.L.; Jacobus, W.E. (1987). Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: The role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* 76: 906-915.
- Andrade, L.O.; Andrews, N.W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*. 3(10):819-23.
- Andrade, S.G e Magalhães, J.B. (1996). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.
- de Andrade AL, Martelli CM, Luquetti AO, de Oliveira OS, Almeida e Silva S, Zicker F. (1992) Serological screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam*. 113(1):19-27.
- Andrade, S.G. (1974). Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 3: 65-121.
- Andrade, S.G., Filho, A.C., de Souza, A.J.M.; de Lima, E.S.; Andrade, Z. (1997). Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Exp. Pathol*. 78: 391-399.
- Andrade, S.G; Magalhães, J.B; Pontes, A. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization* 63: 721-726.
- Aouad, F.; Florence, A.; Zhang, Y.; Collins, F.; Henry, C.; Ward, R.J.; Crichton, R.R. (2002). Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorg Chim Acta* 339: 470-480.
- Arantes, J.M.; Pedrosa, M.L.; Martins, H.R.; Veloso, V.M.; de Lana. M.; Bahia, M.T.; Tafuri, W.L.; Carneiro, C.M. *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice (2007). *Exp. Parasitol*. 117(1):43-50.
- Arnaiz, M.R.; Fichera, L.E.; Postan, M. (2002). Cardiac myocyte hypertrophy and

proliferating cell nuclear antigen expression im Wistar rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology* 88: 919-925.

Avila, H.A.; Sigman, D.S.; Cohen, L.M.; Millikan, R.C.; Simpson, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. (1991). *Mol Biochem Parasitol.* 48(2):211-21.

Baggs, R.B. e Miller, S.A. (1973). Nutritional iron deficiency as a determinant of host resistance in the rat. *J Nutr* 103: 1554-1560.

Baliga, B.S.; Kuvibidila, S.R. e Suskind, R.M. (1982). Effect of iron deficiency on the cell mediated immune response. *Ind J Pediatr* 49: 431-445.

Bahia-Oliveira, L.M.; Gomes, J.A.; Cançado, J.R.; Ferrari, T.C.; Lemos, E.M.; Luz, Z.M.; Moreira, M.C.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. (2000) *J Infect Dis.* 182(2):634-8.

Barnes, D. e Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22: 649-655.

Barreto, P.C.A. e Lanni, M.B. (1994). A forma indeterminada da moléstia de Chagas: conceito e implicações médico-legais. *Rev Soc Cardiol SP* 4:129-132.

Barry, M.; Flynn, D.M.; Letsky, E.A.; Risdon, R.A. (1974). Long-term chelation therapy in thalassaemia major: effect on liver iron concentration, liver histology, and clinical progress. *Br Med J* 909:16-20.

Ben Younés-Chennoufi, A; Hontebeyrie-Joskowicz, M; Tricottet, V; Eisen, H; Reynes, M; Said, G. (1998). Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infect mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 77-83.

Ben Younés-Chennoufi, A; Said, G; Eisen, H; Durand, A; Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1988). Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). *Transactions R Soc Trop Med Hyg* 82: 84-89.

Bergeron, R.J. (1986). Iron: a controlling nutrient in proliferative processes. *Trends Biochem Sci* 11: 133-136.

Bice, D.E.; Zeledon, R. (1970). Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J Parasitol.* 56(4) 663-70.

Blakley, B.R. e Hamilton, D.L. (1988). The effect of iron deficiency on the immune response in mice. *Drug Nutrient Interactions* 5: 249-255.

Borges, M.M.; Curi, P.R. e Kloetzel, J.K. (1992b). Modulation of parasitemia and antibody response to *Trypanosoma cruzi* by cyclophosphamide in *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34: 1-8.

- Bothwell, H.; Charlton, R.W.; Cook, J.D. e Finch, C.H. (1979). Iron metabolism in Man. *Blackwell Oxford* 284-306.
- Bowern, N.; Ramshaw, I.A.; Clark, I.A.; Doherty, P.C. (1984). Inhibition of autoimmune neuropathological process by treatment with an iron-chelating agent. *J Exp Med* 160: 1532- 1543.
- Breidbach, T.; Scory, S.; Krauth-Siegel, R.L.; Steverding, D. (2002). Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol* 32: 473-479.
- Brener, Z. (1977). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: Two types of parasite populations presenting distinct characteristics. In 'Science Publication, Chagas Disease'. *Pan American Health Organization* 347: 11-21.
- Brener, Z. (1985). General Review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 1-8.
- Brener, Z. (1986). Why vaccines do not work in Chagas disease. *Parasitol Today* 2: 196-197.
- Brener, Z. e Chiari, E. (1967). Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev Inst Med trop S Paulo* 9:197-207.
- Brener, Z. e Gazzinelli, R.T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103-110.
- Brener, Z.; Costa, C.A.G.; Chiari, C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 18: 450-455.
- Brittenham, G.M. (1988). Iron chelatings agents. In: *Current Therapy in Hematology Oncology* 3:149-153.
- Bullen, J.J.; Spalding, P.B.; Ward, C.G.; Gutteridge, J.M.C. (1991). Hemochromatosis, iron, and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*. *Arch Int Med* 151: 1606-1609.
- Buscaglia, C.A e Di Noia, J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes Infect* 5: 419-427.
- Cabantchik, Z.; Glickstein, H.; Golenser, J.; Loyevsky, M. e Tsafack, A. (1996). Iron chelators: Mode of action as antimalarials. *Acta Haematologica* 70-77.
- Camargo, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of metacyclic Trypanosomes in Liquid Media (1964). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 12:93-100.
- Campos, M.A.; Gazzinelli, R.T. (2004) *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm*. 13: 139-143.

- Cançado, J.R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with Benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 44: 29-37.
- Cardillo, F.; Voltarelli, J.C.; Reed, S.G.; Silva, J.S. (1995). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* 64: 128-134.
- Cardoso, J.E. e Brener, Z. (1980). Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 75: 97-104.
- Carotenuto, P.; Pontesilli, O.; Cambier, J.C.; Hayward, A.R. (1986). Desferoxamine blocks IL-2 receptor expression on human T lymphocytes. *J Immunol* 136: 2342-2347.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chiari, E. (1974). Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture forms kept in laboratory for different periods of time. *Rev Int Med Trp São Paulo*. 16(2):433-45.
- Chiari, E.; Dias, J.C.; Lana, M.; Chiari, C.A. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Jan-Mar; 22(1):19-23.
- Cinatl, J. Jr.; Cinatl, J.; Rabenau, H.; Gumbel, H.O.; Kornhuber, B.; Doerr, H.W. (1994). *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication by desferrioxamine. *Antiviral Res* 25: 73-77.
- Cinatl, J. Jr.; Cinatl, J.; Weber, B.; Rabenau, H.; Gumbel, H.O. Chenot, J.F.; Scholz, M.; Encke, A.; Doerr, H.W. (1995). *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endotelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral Res* 27: 405-418.
- Cinque, G.M.; Szajnman, S.H.; Zhong, L.; Docampo, R.; Schvartzapel, A. J.; Rodrigues, J.B. e Gros, E.G. (1998). Structure-activity relationship of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Medicinal Chemistry* 1540-1554.
- Coura, J.R., de Castro, S.L., 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 3-24.
- Coura, J.R.; Anunziato, N.; Willcox, H.P. Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro (1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78(3):363-72.
- Crichton, R.R. e Ward, R.J. (1992). Structure and molecular biology of iron binding-proteins and the regulation of free iron pools. In: Lauffer RB, editor. *Iron and human diseases*. Boca Raton CRC Press Inc 10: 23-75.
- Cummins, A.G.; Duncombe, V.M. e Bolin, T.D. (1978). Suppression of rejection of *Nippostrongylus brasiliensis* in iron and protein deficient rats: Effect of syngenic lymphocyte transfer. *Gut* 19: 823-826.

- Cummings, K.L.; Tarleton, R.L. (2004). Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun* 72, 4081-4089.
- D' Império Lima, M.R.; Eisen, H.; Minoprio, P.; Joskowiez, M.; Coutinho, A. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol* 127: 353-356.
- Dallman, P.R. (1986). Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Ann Rev Nutr* 6: 13-40.
- Davies, K.J.A.; Maguire, J.J.; Brooks, G.A.; Dallman, P.R.; Packer, L. (1982). Muscle mitochondrial bioenergetics oxygen supply, and work capacity during dietary iron deficiency and repletion. *Am J Physiol* 242: 418-427.
- De Rezende, J.M.; Moreira, H. (1988). Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. *Arg Gastroenterol* 25:32-43.
- De Sousa, M. Immune cell functions in iron overload (1989). *Clin. Exp. Immunol.* 75(1):1-6.
- Dhur, A.; Galan, P. e Hercberg, S. (1989). Iron status, immune capacity and resistance to infections. *Comp Biochem Physiol* 94: 11-19.
- Dias, J.C.P. (1989). The indeterminate form of human chronic chagas' disease- a clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 147-156.
- Do campo, R. e Moreno, S.N.J. (1983). Oxigen radicals in chemistry and biology, BORNES, W. et. alii, Berlin, 4.
- Duncombe, V.M.; Bolin, T.D. e Davis, A. (1979). The effect of iron and protein deficiency on the development of acquired resistance to reinfection with *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. *Am J Clin Nutr* 32: 553-558.
- Dutra, W.O.; Martins- Filho, O.A.; Cançado, J.R.; Pinto-Dias, J.C.; Brener, Z.; Gazzinelli, G.; Carvalho, J.F.; Colley, D.G. (1996). Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol* 43: 88-93.
- Dutra, W.O.; Colley.; D.G.; Pinto-Dias, J.C.; Gazzinelli, G.; Brener, Z.; Pereira, M.E.; Coffman, R.L.; Correa-Oliveira, R.; Carvalho-Parra, J.F. (2000). Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5⁺ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scan J Immunol* 51: 91-97.
- Dutra, W.O.; Rocha, M.O.C.; Teixeira, M.M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology* 21: 581- 587.
- Esievo, K.A.; Saror, D.I.; Ilemobade, A.A. e Hallaway, M.H. (1982). Variation in erythrocyte and free sialic acid serum concentrations during experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Res Vet Sci* 32: 1-15.
- Factor, S.; Cho, M.; Wittner, M.; Tanowitz, H. (1985). Abnormalities of the coronary

- microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 34: 246-253.
- Filardi, I.S. e Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 755-759.
- Finch, C.A. e Huebers, H. (1982). Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med* 306:1520.
- Fleming, R.E.; Bacon, B.R (2005). Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 17:1769-78.
- Freeman, L.M.; Roubenoff, R. (1994). The nutrition implications of cardiac cachexia. *Nutr Rev* 52: 340- 347.
- Galan, P.; Davila, M.; Mekki, N. e Hereberg, S. (1988). Iron deficiency, inflammatory processes and humoral immunity in children. *Int J Vit Nutr Res* 58: 225-230.
- García, G.A. ; Arnaiz, M.R. ; Laucella, S.A.; Esteva, M.I. ; Ainciart, N. ; Riarte, A. ; Garavaglia, P.A. ; Fichera, L.E. ; Ruiz, A.M. (2006). Immunological and pathological responses in balb/c mice induced by genetic administration of Tc13 tul antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1-12.
- Garcia, S.; Ramos, C.O., Senra, J.F.V.; Vilas-Boas, F., Rodrigues, M.M., Campos-de-Carvalho, A.C.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Soares M.B.P. (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' Disease decreases cardiac alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1521-1528.
- Gazzinelli, R.T. ; Gazzinelli, G. ; Cancado, J.R.; Cardoso, J.E.; Brener, Z.; Colley, D.G. (1990). Two models of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas disease: correlations with clinical forms of infection. *Res Immunol* 140: 757-761.
- Giordanengo, L.; Guinazu, N. C.; Stempin, R.; Fretes, F.; Cerban.; Gea, S. (2002). Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor parasite. *Eur J Immunol* 32:1003–1011.
- Gironès, N, e Fresno, M. (2003). Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *19(1):19-22*.
- Gomes, M.L.; Macedo, A.M.; Vago, A.R.; Pena, S.D.; Galvão, L.M.; Chiari, E. (1998). *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88: 28- 33.
- Griffiths, E. e Bullen, J.J. (1999). Iron and infection. Molecular, physiological, and clinical aspects. *Wiley Chichester* 2: 2.
- Grimaud, J.A. e Andrade, S.G. (1984). *Trypanosoma cruzi*: Relationship between the intracellular parasitic forms and cardiac myocells. *Cel Mol Biol* 30: 59-65.
- Guarner, J.; Bartlett, J.; Zaki, S.R.; Colley, D.G.; Grijalva, M.J.; Powell, M. R. (2001).

- Mouse model for Chagas Disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(2): 152-158.
- Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Tafuri, W.L.; Galvão, L.M.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Ataíde, S.K.; Bahia, M.T. (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.* (84)1:9-17.
- Harvey, P.W.J.; Bell, R.G. e Nesheim, M.C. (1985). Iron deficiency protects inbred mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* 50: 932-934.
- Heijblom, G. S. e Santos, L. M. P. (2007). Anemia ferropriva em escolares da primeira série do ensino fundamental da rede pública de educação de uma região de Brasília, DF. *Rev. bras. epidemiol* 10: 258-266.
- Hershko, C. e Peto, T.E.A. (1988). Deferroxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *J Exp Med* 168: 375-387.
- Higuchi, M.L.; De Moraes, C.F.; Pereira Barreto, A.C.; Lopes, E.A.; Stolf, N.; Bellotti, G.; Pileggi, F. (1987). The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease, a study based on endomyocardial biopsies. *Clinical Cardiology* 10: 665-670.
- Higuchi, M.L. ; Ries, M.M. ; Aiello, V.D. ; Benvenuti, L.A. ; Gutierrez, P.S. ; Bellotti, G. ; Pileggi, F. (1997). Association of an increase in CD8+T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 56: 485-489.
- Holbein, B.E.; Jericho, K.W.F. e Likes, G.C. (1979). Neisseria meningitidis infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strain, and pathology. *Infect Immun* 24: 545-551.
- Humbert, J.R. e Moore, L.L. (1983). Iron deficiency and infection: a dilemma. *J Ped Gastroent Nutr* 2: 403-406.
- Igbokwe, I.O. e Anosa, V.O. (1989). Response to anaemia in experimental *Trypanosoma vivax* infection of sheep. *J Comp Path* 100: 111-118.
- Jiang, X.; Baldwin, C.L. (1993). Iron augments macrophage-mediated killing of *Brucella abortus* alone and in conjunction with interferon-gamma. *Cell Immunol* 148:397-407.
- Jones, R.L.; Peterson, C.M.; Grady, R.W.; Kumbaraci, T. e Cerrami, A. (1977). Effects of iron chelators and iron overload on *Salmonella* infection. *Nature* 267: 63-64.
- Kawabata, H.; Germain, R.S.; Vuong, P.T.; Nakamaki, T.; Said, J.W.; Koeffler, H.P. (2000). Transferrin receptor 2- α supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and *in vivo*. *J Biol Chem* 275:16618-16625.
- Keberle, H. (1964). The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann NY Acad Sci* 119: 759-768.

- Kent, S.; Weinberg, E.D e Stuart-MacAdam, P. (1990). Dietary and prophylactic iron supplements: helpful and harmful. *Human Nature* 1: 55-81.
- Kloetzel, J.K.; Milder, R. e Umezawa, E.S. (1984). *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. *Rev Inst Med Trop SP* 26: 179-185.
- Kuvibidila, S.; Warriar, R.P. (2004). Differential effects of iron deficiency and underfeeding on serum levels of interleukin-10, interleukin-12p40, and interferon-gamma in mice. *Cytokine* 26:73-81.
- Lages-Silva, E.; Filardi, L.; Brener, Z. (1990). Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 401-405.
- Laguens, R.P.; Cabeza Meckert, P.; Chambo, G.J. e Gelphi, R.J. (1981b). Chronic Chagas' disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina* 41: 40-43.
- Laguens, R.P.; Cabeza Meckert, P.; Gelpi, R.J. (1981a). Chronic Chaga's disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina* 41: 35-39.
- Lalonde, R.G. e Holbein, B.E. (1984). Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *J Clin Invest* 23: 470-476.
- Lee, C.M.; Glasgow, G.Y.; Aboko-Cole, G.F. e George, Y.G. (1977). Interaction of nutrition and infection: Effect of iron deficiency on resistance to *Trypanosoma lewisi*. *Internacional Journal of Biochemistry* 525-529.
- Lee, P.; Mohammed, N.; Marshall L Abeyasinghe, R.D.; Hilder, R.C.; Porter, J.B.; Singh, S. (1993). Intravenous infusion pharmacokinetics of desferrioxamine in thalassaemic patients. *Drug Metab Dispos* 21: 640-644.
- Lenzi, H.L.; Oliveira, D.N.; Lima, M.T.; Gattass, C.R. (1996). *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol* 84: 16-27.
- Leon, J.S. e Engman, D.M. (2001). Autoimmunity in chagas heart disease. *Int J Parasitol* 31: 555-561.
- Lesnefsky, E.J. (1994). Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. *Adv Exp Med Biol* 366:129-146.
- Letendre, E. e Holbein, B.E. (1983). Turnover in the transferrin iron pool during the hypoferremic phase of experimental *Neisseria meningitidis* infection in mice. *Infect Immun* 39: 50-59.
- Letendre, E.D. (1985). The importance of iron in the pathogenesis of infection and neoplasia. *Trends Biochem Sci* 12: 166-168.

- Lima, E.S.; Andrade, Z.A.; Andrade, S.G. (2001). TNF- α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Path* 82: 327-336.
- Lima, M.F. e Villalta, F. (1989). *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite adhesion molecule. *Mol Biochem Parasitol* 33: 159-170.
- Loo, V.G. e Lalonde, R.G. (1984). Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 45: 726-730.
- Mabeza, G.F.; Biemba, G.; Gordeuk, V.R. (1996). Clinical studies of iron chelators in malaria. *Acta Haematologica* 95: 78-86.
- Macedo, A.M.; Machado, C.R.; Oliveira, R.P.; Pena, S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 1-12.
- Machado, A.B.M.; Machado, C.R.S.; Gomes, C.G. (1975). Depletion of heart norepinephrine in experimental acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 31: 1202-1203.
- Mahmoud, M.S. (1999). Effect of deferoxamine alone and combined with pyrimethamine on acute toxoplasmosis in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 29: 791-803.
- Malvezi, A.D.; Cecchini, R.; De Souza, F.; Tadokoro, C.E.; Rizzo, L.V.; Pinge-Filho, P. (2004). Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology and Medical Microbiology* 41: 69-77.
- Marcondes, M.C.G.; Borelli, P.; Yoshida, N.; Russo, M. (2000). Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes and infection* 2: 347-352.
- Martin, D.; Tarleton, R.L. (2004) Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* 201, 304–317
- Martelius, T.; Scholz, M.; Krogerus, L.; Hockerstedt, K.; Loginov, R.; Bruggeman, C.; Cinatl JR, J.; Doerr, H.W.; Lautenschlager, I. (1999). Antiviral and immunomodulatory effects of desferrioxamine in cytomegalovirus-infected rat liver allografts with rejection. *Transplantation* 68: 1753-1761.
- Martins, H.R.; Figueiredo, L.M.; Valemiel-Silva, J.C.; Carneiro, C.M.; Machado-Coelho G.L.L.; Bahia, M.T.; Martins-Filho, A.O.; Macedo, A.M.; Lana, M. Usefulness of parasitological and serological methods to define early post- 1 therapeutic efficacy in dual-infection with *Trypanosoma cruzi* stocks from 2 different genotypes in mice: is there a parasitological cure? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Martins, G.A.; Petkova, S.B.; Machado, F.S.; Kitsis, R.N.; Weiss, L.M.; Wittner, M.; Tanowitz, H.B.; Silva, J.S. (2001). Fas-Fas-L interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology* 102: 122-129.

- McCord, J.M. (1996). Effects of positive iron status at a cellular level. *Nutr Rev* 54: 85-88.
- Melo, R.C. e Brener, Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol* 64: 475-482.
- Michailowsky, V.; Murta, S.M.F.; Carvalho-Oliveira, L.; Pereira, M.E.S.; Ferreira, L.R. P.; Brener, Z.; Romanha, A.J.; Gazzinelli, R.T. (1998). Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2549-2556.
- Milder, R.; Kloetzel, J.K. e Deane, M.P. (1977). Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *T. cruzi*: II. Intracellular fate of bloodstream forms. *Rev Inst Med Trop* 19: 313-322.
- Miller, G. E.; Cohen, S. e Ritchey, A. K. (2002). Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol* 6: 531-541.
- Minoprio, P. (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches. *Int J Parasitol* 31: 588-591.
- Minoprio, P.; Coutinho, A.; Joskowick, M.; D' Império-Lima, M.R.; Eisen, H. (1986a). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol* 24: 669- 679.
- Minoprio, P.; Eisen, H.; Forni, L.; D' Império-Lima, M.R.; Joskowick, M.; Coutinho, A. (1986b). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol* 24: 661- 668.
- Minoprio, P.; Itohara, S.; Heusser, C.; Tonegawa, S.; Coutinho, A. (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev* 112: 183-207.
- Miyamoto, C.T.; Gomes, M.L.; Marangon, A.V.; Araújo, S.M.; Bahia, M.T.; Lana, M. Toledo, M.J. (2006). *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. 112(3):198-201.
- Moncayo, A.; Ortiz Yanine, M.L. (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 100(8): 663-77.
- Moncayo, A. (1999). Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 401- 404.
- Morato, M.J.; Brener, Z.; Cançado, J.R.; Nunes, R.M.; Chiari, E.; Gazzinelli, G. (1986). Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. *Am J Trop Med Hyg* 35: 505-511.
- Morris, S.A.; Tanowitz, H.B.; Wittner, M.; Bilezikian, J.P. (1990). Pathophysiological

- insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation* 82: 1900-1909.
- Mosca, W.; Plaja, J.; Hubsch, R.; Cedillos, R. (1985). Longitudinal study of immune response in human Chagas disease. *J Clin Microbiol* 22: 438-441.
- Murray, M.J.; Murray, A.B.; Murray, M. e Murray, C. J. (1978). The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *Br Med J* 2: 1113-1115.
- Murray, M.J.; Murray, A.B.; Murray, M.B.; Murray, N.J. e Murray, C.J. (1981). Is the 'physiological' iron deficiency of pregnancy a priming mechanism of host defense against infection?. *Am J Clin Nutr* 34: 644-649.
- Murray, M.J.; Murray, A.B.; Murray, N.J. e Murray, M.B. (1975). Reffeding malaria and hyperferraemia. *Lancet* 1: 653-654.
- Murta, S.M.F.; Romanha, A.J. (1998). In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116: 165-171.
- Murta, S.M.F.; Ropert, C.; Alves, R.O.; Gazzinelli, R.T.; Romanha, A.J. (1999). In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunology*, 21: 535-544.
- Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326.
- Neilands, J.B. (1981). Iron absorption and transport in microorganisms. *Ann Rev Nutr* 1: 27-46.
- Nickell, S.P.; Stryker, G.A.; Arevalo, C. (1993). Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8⁺, MHC- restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J Immunol* 150:1446-1457.
- Niederau, C.; Fischer, R.; Sonnenberg, A.; Stremmel, W.; Trampisch, H.J.; Strohmeyer, G. (1985). Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 313: 1256-1262.
- Nishiya, K.; Horwitz, D.A. (1982). Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 129: 2519- 2523.
- Nogueira, N.; Chaplan, S. e Cohn, Z.A. (1980). *Trypanosoma cruzi*: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. *J Exp Med* 152: 447-451.
- Nogueira, N.; Gordon, S. e Cohn, Z.A. (1977). *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophages function during infection. *J Exp Med* 146: 157-171.
- Olivieri, B.P.; Cotta-De-Almeida, V.; Araujo-Jorge, T. (2002). Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8⁺ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3790-3796.
- Omara, F.O.; Blakley, B.R.; Huang, H.S. (1994). Effect of iron status on endotoxin-

- induced mortality phagocytosis and IL-1 and TNF- α production. *Vet Hum Toxicol* 36: 423-428.
- Payne, S.M. e Finkelstein, R.A. (1978). The critical role of iron in host-bacterial interactions. *J Clin Invest* 61: 1428-1440.
- Paller, M.S.; Hedlund, B.E. (1988). Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int* 474-480.
- Pedrosa, M.L.; Nicoli, J.R.; Silva Marcelo, E.; Silva Márcio, E.; Silva, M.E.C.; Vieira, L.Q.; Bambirra, E.A. e Vieira, E.C. (1993). The effect of iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Comp Biochem Physiol* 106: 813-821.
- Pedrosa, M.L.; Silva Marcelo, E.; Silva Márcio, E.; Silva, M.E.C.; Nicoli, J.R. e Vieira, E.C. (1990). The effect of iron deficiency and iron overload on the evolution of Chagas' disease produced by three strains of *Trypanosoma cruzi* in CFW mice. *Comp Biochem Physiol* 97: 235-243.
- Petersen, C.A., Krumholz, K.A., Burleigh, B.A. (2005). Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 β -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi* *Infection and Immunity* Oct: 6974-6980.
- Petkova, S.B.; Huang, H.; Factor, S.M.; Pestell, R.G.; Bouzahzah, B.; Jelicks, L.A.; Weiss, L.M.; Douglas, S.A.; Wittner, M.; Tanowitz, H.B. (2001). The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol* 31: 499-511.
- Pinto, P.L.S.; Takami, R.; Nunes, E.V.; Guilherme, C.S.; Oliveira Júnior, O.C.; Gama-Rodrigues, J.; Okumura, M. (1999). Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* 54(5): 141-146.
- Pizzi, T.; Prager, R. (1952). Immunity to infection induced by culture of *Trypanosoma cruzi* of attenuated virulence; preliminary communication. *Bol Inf Parasit Chli.* 7(2):22-4.
- Plata, F.; Wietzerbin, J.; Pons, F.G.; Falcoff, E.; Eisen, H. (1984). Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Eur J Immunol* 14: 930-935.
- Polak, A. e Richele, R. Mode of action of the 2- Nitromidasole derivative benzonidazole (1978). *Ann. Trop. Med. Parasitol* 72(1): 45-54.
- Pollack, S.; Rossan, R.N.; Davidson, D.E.; Escajadillo, A. (1987). Desferrioxamine suppresses *Plasmodium falciparum* in Aotys monkeys. *Proc Soc Exp Biol Med* 184: 162-164.
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.
- Pupulin, A.R.T.; Paludetto, A.; da Silva, S.V.; Bracht, A.M.K. (2005). Benznidazol effects in perfused rat liver. *RBAC* 37(3): 153-156.

- Puschman, M. e Ganzoni, A.M. (1977). Increased resistance of iron deficient mice to Salmonella infection. *Infect Immunity* 663-664.
- Raventos-Suarez, C.; Pollack, S. e Nagel, R.L. (1982). *Plasmodium falciparum*: inhibition of 'in vitro' growth by desferrioxamine. *Am J Trop Med Hyg* 31: 919-922.
- Reed, S.G. (1988). *In vivo* administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* 140: 4342-4347.
- Reis, D.D.; Jones, E.M.; Tostes, S.Jr.; Lopes, E.R.; Gazzinelli, G.; Colley, D.G.; McCurley, T.L. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alfa⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 637-642.
- Roeser, H.P. (1980). Iron metabolism in inflammation and malignant disease. In Iron in Biochemistry and medicine. II. A. Jacobs and M. Worwood, editors. *Academic Press Inc New York* 605-640.
- Romanha, A.J.; Alves, R.O.; Murta, S.M.; Silva, J.S.; Ropert, C.; Gazzinelli, R.T. (2002) Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis.* 186(6):823-8.
- Rottenberg, M.E.; Cardoni, R.L.; Titto, E.H.; Moreno, M.; Segura, E.L. (1988). *Trypanosoma cruzi* immune response in mice immunized with parasite antigens. *Experimental Parasitology* 65: 101-108.
- Rouser, G.; Nelson, G.J.; Fleicher, S. (1968). Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs. In: Chapman D. Biological membranes: physical fact and function. *New York: Academic Press* 5-69.
- Ruiz, R.C.; Fernandes, M. e Irulegui, I. (1989). Observation of marked thrombocytopenia during the course of acute experimental Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 26.
- Russo, M.; Starobinas, N.; Marcondes, M. C. G.; Minoprio, P.; Honteyberie-Joskowicz, M. (1996). The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunology Letters* 49: 163-168.
- Saleppico, S.; Mazzolla, R.; Boelaert, J.R.; Puliti, M.; Barluzzi, R.; Bistoni, F.; Blasi, E. (1996). Iron regulates microglia cell-mediated secretory and effector functions. *Cell Immunol* 170:251-259.
- Santos, F.R.; Pena, S.D.J.; Epplen, J.T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 90: 655-656.
- Schlemper Jr.; B.R.; Avila, C.M.; Coura, J.R. e Brener, Z. (1983). Course of infection

and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Rev Soc Br Med Trop* 16: 23-30.

Scott, P.; Trinchieri, G. (1995). The role of natural Killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 7: 34.

Shadid, M.; Buonocore, G.; Groenendaal, F.; Moison, R.; Ferrali, M.; Berger, H.M.; Van Bel, F. (1998). Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett* 248: 5-8.

Siimes, M.A.; Refino, C.; Dallman, P.R. (1980). Manifestations of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. *Am J Clin Nutr* 33: 570-574.

Silva, J.C.; Pirmez, C.; Morgado, M.G.; Galvao-Castro, B. (1985). Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infection. *Parasite Immunol* 7: 457-466.

Silva, J.S.; Machado, F.S.; Martins, G.A. (2003). The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci* 1: 314- 325.

Silva, J.S.; Vespa, G.N.R.; Cardoso, M.A.C.; Aliberti, J.C.S.; Cunha, F.Q. (1995). Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 63: 4862-4867.

Silver, B.J.; Hamilton, B.D.; Toosi, Z. (1997). Suppression of TNF- α gene expression by hemin: implications for the role of iron homeostasis in host inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 62: 547-552.

Singh, P.K.; Jones, M.M.; Lane, J.E; Nesses, A.; Zimmerman, L.J.; Ribeiro-Rodrigues, R.; Richter, A.; Stenger, M.R. e Carter, C.E. (1997). Synthesis and *in vitro* trypanocidal activity of some novel iron chelating agents. *Arzneimittelforschung* 311-315.

Soares, M.B. *et al.* (2001). Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.* 159, 703-709.

Soares, M.B.P.; Pontes-de-Carvalho, L.; Ribeiro-dos-Santos, R. (2001). The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 73: 547-559.

Summers, M.; Jacobs, A.; Tudway, D.; Perera, P.; Ricketts, C. (1979). Studies in desferrioxamine and ferrioxamine in normal and iron-loaded subjects. *Br J Haematol* 42: 547-555

Sword, C.P. (1966). Mechanism of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection. Influence of iron. *J Bacteriol* 92: 536-542.

- Tafuri, W.L. (1970). Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas's disease: light and electron microscopic studies. *Am J Trop Med Hyg* 19: 405-417.
- Tanaka, T.; Araki, E.; Nitta, K.; Tateno, M. (1987). Recombinant human TNF- α depresses serum iron in mice. *J Biol Responses Modif* 6: 484-488.
- Tang, L.X.; Yang, J.L.; Shen, X. (1997). Effects of additional iron-chelators on Fe(2+)-initiated lipid peroxidation: evidence to support the Fe²⁺ Fe³⁺ complex as the initiator. *J Inorg Biochem* 68: 265-272.
- Tanji, K.; Imaizumi, T.; Matsumiya, T.; Itaya, H.; Fujimoto, K.; Cui, X.F.; Toki, T.; Ito, E.; Yoshida, H.; Wakabayashi, K.; Satoh K. (2001). Desferrioxamine, an iron chelator, upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in a human macrophage cell line. *Bioch et Biophys Acta* 1530: 227-235.
- Tanowitz, H.B.; Kirchhoff, L.V.; Simon, D.; Morris, S.A.; Weiss, L.M.; Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 400-419.
- Tarleton, R.L e Zhang, L. (1999). Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15: 94-99.
- Tarleton, R.L. (2001). Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 31: 550-554.
- Tarleton, R.L.; Grusby, M.J.; Postan, M.; Glimcher, L.H. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* 8: 13-22.
- Tarleton, R.L.; Koller, B.H.; Latour, A.; Postan, M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* 356: 338-340.
- Teixeira, A.R.L.; Teixeira, M.L. e Santos-Busch, C.A. (1975). The immunology of Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *American Journal of Pathology* 80: 163-180.
- Trischmann, T.; Tanowitz, H.; Wittner, M.; Bloom, B. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Experimental Parasitology* 45: 160-168.
- Toledo, M.J.O; Tafuri, W.L.; Bahia, M.T.; Tibayrenc, M.; Lana, M. (2004). Genetic diversity and drug reistence in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Res. Adv. In Antimicrob. Agents & Chemother.* 4 11-20.
- Toledo, M.J.O.; Guilherme, A.L.F.; Silva, J.C.; Gasperi, M.V.; Mendes, A.P.; Gomes, M.L.; Araújo, S.M. (1997). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from diferent endemic areas of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 39: 283-290.
- Uchoa, E.; Firmo, J.O.A.; Dias, E.; Pereira, M.S.; Gontijo, E. (2002). Signos,

- significados e ações associados à doença de Chagas. *Cad Saúde Pública*. 18: 71-79.
- Umekita, L.F.; Mota, I. (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 253-258.
- Vago, A.R.; Andrade, L.O.; Leite, A.A.; D' Avila Reis, D.; Macedo, A.M.; Adad, S.J.; Tostes, S Jr.; Moreira, M.C.; Filho, G.B.; Pena, S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverge organs. *Am J Pathol* 156: 1805-1809.
- Vespa, G.N; Cunha, F.Q; Silva, J.S. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Immun* 62: 5177-5182.
- Veloso, V.M; Carneiro, C.M.; Toledo, M.J.; Lana, M.; Chiari, E.; Tafuri, W.L.; Bahia, M.T. (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96(7):1005-11.
- Villalta, F.; Kierszenbaum, F. (1983). Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. *J Immunol* 131: 1504-1510.
- Villalta, F.; Kierszenbaum, F. (1984). Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: uptake and mechanism of destruction. *J Immunol* 133: 3338-3343.
- Vitor, R.W.; Chiari E. (1987). Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. I. Different antigenic extracts. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 29: 178-182.
- Voller, A.; Bidwell, D.E. e Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO* 53: 55-65.
- Webb, J.C.; Kiess, M.C.; Chan-Yan, C.C. (1986). Malnutrition and the heart. *Can Med Assoc J* 8: 135- 753.
- Weiel, J.E. e Hamilton, T.A. (1984). Quiescent lymphocytes express intracellular transferrin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 119: 598-602.
- Weinberg, E D. (1974). Iron and susceptibility to infections disease. *Science* 184: 952-956.
- Weinberg, E.D. (1978). Iron and infection. *Microbiol Rev* 42: 45-66.
- Weinberg, E.D. (1984). Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev* 64: 65-102.
- Weiss, G.; Fuchs, D.; Hausen, A.; Reibnegger, G.; Werner, E.R.; Werner-Felmayer, G.;

Wachter, H. (1992). Iron modulates interferon gamma effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. *Exp Hematol* 20:605-610.

World Health Organization (2005). Tropical Disease Research: progress 2003-2004 Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. Programme Report 17, Geneva.

Zhang, L. e Tarleton, R.L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chaga's disease. *J Infect Dis* 180: 480-486.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)