

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Cássia Mariana Bronzon da Costa

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

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Cássia Mariana Bronzon da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

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

Ribeirão Preto

2017

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

Da Costa, Cássia Mariana Bronzon

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

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

Orientadora: Carraro-Abrahão, Ana Amélia.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

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

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

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

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

A eles, meus sobrinhos amados;

Dedico

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

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

(Salmos 121 7-8)

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos docentes do Laboratório de Parasitologia, pela contribuição fundamental.

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

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

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

Muito obrigada!

De maneira muito especial, meu imenso agradecimento aos animais utilizados na pesquisa, que inocentemente contribuíram para a realização deste trabalho.

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

RESUMEN

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

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

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

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

Introdução

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

1.2 Contexto histórico e a descoberta de Carlos Chagas

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

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

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

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

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

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

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

Baseado em seus conhecimentos sobre a malária, cuja transmissão acontece também por inseto hematófago, Carlos Chagas retorna a Lassance para

investigar outros hospedeiros vertebrados de *T. cruzi*, com suspeita de que o homem também fosse um deles. Assim, Chagas identificou a presença do parasita em um gato e, no dia 14 de abril de 1909, Chagas identificou a presença de *T. cruzi* no sangue de uma criança de dois anos, em estado febril, de nome Berenice. A nota foi publicada na revista *Brasil Médico*, juntamente com outro texto lido por Oswaldo Cruz na Academia Nacional de Medicina. Outros dois artigos foram publicados na Alemanha e França. Em 1913 e 1921, Chagas recebe indicações ao Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia (CHAGAS, 1909a; CHAGAS, 1909b; CHAGAS, 1909c; CHAGAS, 1909d; CARINI, 1912; KROPF & SÁ, 2009; CARVALHEIRO et al., 2009).

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

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

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença zoonótica, transmitida pelas fezes do inseto “barbeiro” ou “*kissing bug*”, pertencente a família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* os principais insetos vetores. O parasita entra no

corpo humano através de microlesões quando o indivíduo coça o local com as fezes contaminadas por *T. cruzi*. Outras formas de transmissão incluem a transfusão de sangue, transplante de órgãos, o leite materno, a transmissão oral e a via congênita através da placenta (BERN et al., 2011; WHO, 2014).

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

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

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

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

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

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

1.4 Doença de Chagas congênita e resposta imune materna

Dados recentes da organização mundial de saúde apontam uma estimativa de 1.125.000 mulheres, em idade fértil, infectadas por *T. cruzi*. De acordo com essa estimativa, a incidência de infecção congênita na América latina é de 8.668 casos por ano (WHO, 2015).

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

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

Há mais de 50 anos, Medawar propôs pela primeira vez a existência de mecanismos regulatórios que suprimem o sistema imune materno em favor do desenvolvimento fetal (MEDAWAR, 1953; BILLINGTON, 2003). Trinta anos mais

tarde, na década de 1980, após a descoberta da heterogeneidade nas populações de células T auxiliares (Th), durante vários anos a tolerância materna em relação aos aloantígenos foi explorada no contexto do paradigma Th1 / Th2. Acreditava-se que células do padrão Th2 juntamente com citocinas atuavam no sentido de anular a resposta Th1 que levava ao aborto (WEGMANN et al., 1993; RAGHUPATHY, 1997). No entanto, a descoberta de mecanismos reguladores da resposta imune mostrou que a relação entre resposta inata e adaptativa é essencial para o sucesso da gravidez (SARGENT et al., 2006; TROWSDALE & BETZ, 2006; CHAOUAT, 2007; SAITO et al., 2007; SAITO et al., 2010).

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

O desenvolvimento do feto frente à resposta imune materna foi amplamente definido como um estado de "tolerância" imunológica. Na literatura, o estado de tolerância frente a doenças infecciosas é a capacidade do organismo de criar condições que limitam o impacto negativo do microrganismo agressor (SCHNEIDER & AYRES, 2008). Contudo, o estado de tolerância na gravidez é definido como a capacidade do organismo materno de facilitar o desenvolvimento e diferenciação embrionária, sem que o sistema imunológico reconheça o feto como invasor. O conceito original de que os antígenos paternos expressos no embrião não eram

reconhecidos foi substituído pela constatação de que a relação materno-fetal é extremamente mais complexa (SISTI et al., 2016).

Atualmente, sabe-se que em gestações bem sucedidas, o sistema imunológico materno responde efetivamente à expressão de antígenos paternos, mas a reatividade imunológica inflamatória é regulada por linfócitos T reguladores. Essas células, identificadas como TCD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺, suprimem ativamente a resposta imune direcionada contra antígenos fetais (SAMSTEIN et al., 2012). Em modelos animais, a deleção de células T reguladoras leva à inflamação uterina, falência na implantação fetal e deficiência nas funções placentárias. Porém, a reintrodução dessas células nesses modelos deficientes restabelece o equilíbrio e conduzem a uma gestação normal (ALIJOTAS-REIG et al., 2014).

1.5 Zinco

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

O Sistema Internacional de Nomenclaturas de Enzimas (*International Union of Biochemistry Enzymes*) classifica as enzimas em seis subclasses: oxirredutases, transferases, hidrolases, lisases, isomerases e ligases, sendo todas elas dependentes de zinco, em alguma de suas funções (KING, 2011). Inúmeras funções

fisiológicas, como absorção intestinal de eletrólitos, divisão celular, regulação de neurotransmissores, atividade tímica e resposta imune são diretamente influenciadas pelo zinco (FUKADA et al., 2011). Devido à grande abrangência de atuação do zinco no funcionamento do organismo, a deficiência desse microelemento compromete a manutenção da homeostasia.

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

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

As baixas concentrações plasmáticas de zinco reduzem o transporte de zinco placentário e podem afetar o suprimento de zinco para o feto (KING, 2000). A deficiência de zinco também altera os níveis circulantes de vários hormônios

associados ao início do parto uma vez que o zinco é essencial para o sistema imunológico. Além disso, a deficiência desse elemento contribui para infecções sistêmicas e intra-uterinas, sendo essas as principais causas de parto prematuro. O baixo peso ao nascer e a prematuridade são fatores de risco significativos para a morbidade e mortalidade neonatal e infantil. Por outro lado, dados da Organização mundial de saúde mostram que a suplementação de zinco pode melhorar os resultados da gravidez para mães e bebês (WHO, 2016).

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

Conclusão

7. CONCLUSÃO

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

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

Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHAGAS, C.. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909c.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE MEIS, J. et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFR1/TNF pathways. **Microbes Infect.**, v.8, p.221-31, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. ***Fol. Clin. Biol.***, v.20, p.191-201, 1953.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TERENZI, F. et al. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.6017-6021, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Anexo
