

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Geral**

**EFEITOS DA DESFERIOXAMINA SOBRE ASPECTOS PARASITOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO AGUDA
PELO *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS.**

Jerusa Marilda Arantes

Belo Horizonte, MG
2011

**EFEITOS DA DESFERRIOXAMINA SOBRE ASPECTOS PARASITOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO AGUDA
PELO *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof^ª Dra. Silvana Maria Elói Santos
Co-Orientador: Prof^º Dr. Olindo Assis Martins Filho.

Belo Horizonte, MG
2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Instituto de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ, sob a orientação da doutora Silvana Maria Elói Santos e co-orientação do doutor Olindo Assis Martins Filho.

Colaboradores:

LBDM (Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração)

CPqRR (Instituto de Pesquisa René Rachou)

FIOCRUZ-MG (Fundação Oswaldo Cruz)

Dr. Olindo Assis Martins-Filho

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo

Laís Maroni (Doutoranda)

Lívia Passos (Iniciação Científica)

LIMP (Laboratório de Imunopatologia)

NUPEB (Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas)

UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dr. Washington Luiz Tafuri

Dra. Cláudia Martins Carneiro

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Amanda Fortes Francisco (Doutoranda)

LBBM (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular)

NUPEB

UFOP

Dra. Maria Lúcia Pedrosa

Maísa Silva (Doutoranda)

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, Juarez e Maria Ercília, as minhas irmãs Úrsula e de coração Doca, a minha avó Hilda e ao meu noivo Fábio que estiveram ao meu lado em todos os momentos e pelo apoio durante todas as dificuldades encontradas.

*“Concedei-me, Senhor,
a serenidade necessária
para aceitar as coisas
que não posso
modificar, coragem para
modificar aquelas que
posso e sabedoria para
distinguir umas das
outras”.*

Reinhold Niebuh

“A Deus, que em sua infinita bondade e pela força que age sobre nós, podendo fazer muito mais do que pedimos ou imaginamos, agradeço por ter me dado coragem de conquistar meus objetivos e de me acalantar nos momentos de fraqueza. A ti ofereço minha vida...”

A meus pais e avó, a quem devo toda a minha gratidão e que desde minha infância, incentivaram-me a estudar sempre. Sou grata pelo amor, carinho e confiança em mim depositada. Obrigada por serem exemplos de dignidade e fortaleza, sempre me mostrando os fatos e a vida como realmente são e nunca me deixando desistir.

A doutora Silvana Elói Santos, pela orientação dedicada e compreensiva que influenciou de forma decisiva a conclusão deste trabalho e pelo apoio, ensinamento e incentivo em importantes etapas. Obrigada por esta convivência mais que agradável, onde eu pude aprender que competência, aprendizagem e liderança somente fazem sentido se vierem acompanhadas de gentileza, atenção, bom humor e principalmente amizade.

Ao doutor Olindo Assis Martins Filho e doutora Andréa Teixeira por seus ensinamentos e pela grande oportunidade de realizar este trabalho no Centro de Pesquisas René Rachou.

A Cláudia Carneiro não só pela sua colaboração, mas também pelos ensinamentos profissionais e pessoais, pela sua paciência, confiança e amizade.

Ao Márcio Sobreira, agradeço pela disponibilidade com que me acolheu no laboratório, pela acessibilidade e conselhos. Pela amizade, paciência e pelas conversas que muito contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração:- Maísa, Carol, Fabi Paixão, Fabi Rocha, Roberta, Renato, Daniel, Maurício, Maria Luíza, Laís, Mateus, Lívia, Amanda, Aretha, Camila, Luíza, Rafaela, Roquélia, Roberta Félix, que me apoiaram no desenvolvimento do trabalho e pela contribuição de cada um em algum momento. Pela agradável convivência, amizade e compreensão.

A todo apoio técnico do laboratório pela enorme ajuda na realização deste trabalho.

A Livinha, Mandinha, Laís, Mateus, Robertinha, Paula e Lorena pela valiosa amizade e constante carinho. Obrigada pelo apoio e por sempre estarem por perto e por me ajudarem na realização deste trabalho. Obrigada por compartilharem momentos de tristezas e grandes alegrias.

A todos os funcionários do Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou que apoiaram a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, a todos os professores, colegas de laboratório e de pós-graduação que de diversas maneiras colaboraram para a sua viabilização.

A todos do LIMP e do LBBM da UFOP por todo o apoio e ajuda. A Maria Lúcia Pedrosa (LBBM) por todo apoio de sempre.

A Paula (Pepê) por toda ajuda, carinho, amizade e conselhos na realização deste trabalho.

A Amanda (Doca) minha irmã de coração, pela grande amizade, amor, companheirismo, lealdade em todos estes anos de convivência e amizade. Pela cumplicidade, dedicação, compreensão e alegria que dividimos em inúmeras etapas da realização deste trabalho. Sem a sua presença tudo teria sido muito mais difícil e impossível. Muito obrigada por tudo!!!!!!

A minha irmã Úrsula por todo carinho, amizade e amor. Muito obrigada por todos os conselhos e pela enorme compreensão.

A minha segunda família em BH, em especial aos meus tios, José Arantes e Aparecida que me acolheram como uma filha. Obrigada pela hospedagem, amparo e carinho. Vocês se tornaram meus segundos pais! As minhas primas Fabiana, Luciana e Rosane por me acolherem como uma irmã. O convívio nos trouxe um grande sentimento de amizade e amor. Adoro muito todos vocês!

Ao meu noivo Fábio por todo amor e por toda compreensão, que por inúmeras vezes, por causa da distância, tivemos que deixar de lado algo que faz de nossas vidas momentos

saudáveis e felizes. Muito obrigada pela paciência, carinho, amizade e pelo incentivo dado a cada momento.

1 - INTRODUÇÃO.....	16
1.1- EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS	17
1.2- IMUNOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS	20
1.3- TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS	25
1.4- STATUS NUTRICIONAL NA INFECÇÃO PELO <i>T. CRUZI</i> E DESFERIOXAMINA (DFA)	28
2 - JUSTIFICATIVA	33
3 - OBJETIVOS.....	35
3.1- OBJETIVOS GERAIS	36
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 - ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1- ANIMAIS UTILIZADOS.....	38
4.2- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.3- PARÂMETROS AVALIADOS	39
4.3.1.1- CURVA DE PARASITEMIA	39
4.3.1.2- TAXA DE MORTALIDADE	40
4.3.1.3- PARASITEMIA PELO TESTE RÁPIDO <i>IN VIVO</i>	40
4.3.2.1- COLETA DE SANGUE.....	41
4.3.2.2- HEMOGRAMA	41
4.3.2.3- AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRO EM CAMUNDONGOS.....	41
4.3.2.4- ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO LINFOCITÁRIO DO BAÇO E PADRÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS PELAS CÉLULAS MONONUCLEARES ESPLÊNICAS	42
4.3.3.1- AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO <i>T. CRUZI</i> EM CULTURA	46
4.3.3.2- ENSAIOS DE VIABILIDADE POR TRYPAN BLUE, APOPTOSE E MOTILIDADE	47
4.4- ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
5 - RESULTADOS.....	50
5.1- PARÂMETROS RELACIONADOS À UTILIZAÇÃO DA DFA NO CURSO DA INFECÇÃO E SUSCEPTIBILIDADE DO <i>T. CRUZI</i> PELO TESTE RÁPIDO <i>IN VIVO</i>	51
5.1.1- AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA E MORTALIDADE NOS ANIMAIS INFECTADOS, TRATADOS (IDFA) E NÃO TRATADOS COM DFA (I).....	51
5.1.2- AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA E MORTALIDADE NOS ANIMAIS INFECTADOS, TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DFA E BZ (IDFA/BZ) E NÃO TRATADOS COM DFA (I)	52
5.1.3- AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA E MORTALIDADE NOS ANIMAIS INFECTADOS, TRATADOS (IBZ) E NÃO TRATADOS COM BZ (I)	53
5.1.4- ANÁLISE DA PARASITEMIA PELO TESTE RÁPIDO <i>IN VIVO</i>	55
5.2- PARÂMETROS RELACIONADOS À UTILIZAÇÃO DA DFA EM BIOMARCADORES DO HOSPEDEIRO	56
5.2.3.1- PERFIL FENOTÍPICO LINFOCITÁRIO NO BAÇO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS I E IDFA.....	59
5.2.3.2- PADRÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS PELAS CÉLULAS MONONUCLEARES ESPLÊNICAS DE ANIMAIS INFECTADOS, TRATADOS OU NÃO COM DFA.....	61
5.3- ATIVIDADE DO FÁRMACO DFA DIRETAMENTE SOBRE O <i>T. CRUZI</i>	65
6 - DISCUSSÃO	69
7 - CONCLUSÕES.....	77
8 - REFERÊNCIAS.....	79
9 - ANEXOS.....	93

- Figura 1- Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por célula $CD4^+$. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R1.....45
- Figura 2- Curvas das médias de parasitemia (A) e percentual de mortalidade (B) de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. (I) animais infectados e não tratados, (IDFA) animais infectados e tratados com DFA. ...51
- Figura 3- Curvas das médias de parasitemia (A) e percentual de mortalidade (B) de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. (I) animais infectados e não tratados, (IDFA/BZ) animais infectados e tratados com DFA e BZ.52
- Figura 4- Curvas das médias de parasitemia (A) e percentual de mortalidade (B) de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. (I) animais infectados e não tratados, (IBZ) animais infectados e tratados com BZ.....54
- Figura 5- Camundongos suíços (n=20) foram inoculados com 50.000 formas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. Animais infectados e não tratados (I), animais infectados e tratados com Desferrioxamina (DFA 25mg/animal), animais infectados e tratados com Benzonidazol (BZ 500 mg/kg) e animais infectados e tratados com Benzonidazol e Desferrioxamina (BZ 500 mg/kg + DFA 25 mg/animal)....55
- Figura 6- Camundongos suíços (n=60) foram infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA. Níveis de ferritina, ferro sérico e capacidade total de ligação de ferro (CTLF) foram avaliados no dia do inóculo (tempo=0) ao 7^o, 14^o e 21^o DAI. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.58
- Figura 7- Percentual médio das células NK ($CD49b^+$), linfócitos B ($CD19^+$) e células $CD4^+$ e $CD8^+$ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção no dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.60
- Figura 8- Percentual de células $NK^+ IFN-\gamma^+ TNF-\alpha^+$ ou $IL-10^+$ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção em relação ao dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As barras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nos períodos avaliados.....62
- Figura 9- Percentual de células $CD4^+$ e $CD8^+ IFN-\gamma^+$, $TNF-\alpha^+$ ou $IL-10^+$ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção em relação ao dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As barras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nos períodos avaliados.....63
- Figura 10- Percentual de células $CD19^+ IFN-\gamma^+$, $TNF-\alpha^+$ ou $IL-10^+$ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção em relação dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As barras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nos períodos avaliados.....64

Figura 11- T. cruzi (cepa Tulahuen) expressando o gene beta- galactosidase da Escherichia coli cultivado por 4 dias em cultura de fibroblastos L929 na presença de diferentes concentrações de Desferrioxamina (DFA). A atividade tripanocida foi calculada pela atividade do gene b- galactosidase. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição do crescimento. O Benzonidazol (BZ) foi utilizado como controle positivo.65

Figura 12- Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do T. cruzi cultivadas em células L929, na presença ou não de Desferrioxamina (DFA). O Benzonidazol (BZ) e a violeta de genciana foram utilizados como controles. Suspensão de 1×10^6 parasitos foram marcadas duplamente com anexina V conjugado com FITC e PI. Os parasitos que não apresentaram marcação com anexina ou PI foram considerados vivos (branco). Os parasitos marcados somente com anexina foram considerados em processo inicial de apoptose (preto). Os parasitos marcados duplamente com PI e anexina foram considerados em processo tardio de apoptose (cinza claro). Os parasitos marcados somente com PI foram considerados mortos (cinza escuro).67

Figura 13- As formas tripomastigotas da cepa Y do T. cruzi foi cultivada em células L929 na presença de diferentes concentrações de Desferrioxamina (DFA) e sua motilidade foi avaliada após 1, 3, 6, 9 e 12 horas. O Benzonidazol (BZ) e violeta de genciana foram utilizados como controle.68

<i>Tabela 1- Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 2- Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em populações leucocitárias.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 3- Parasitemia de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do Trypanosoma cruzi e tratados com DFA.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 4- Parasitemia de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do Trypanosoma cruzi e tratados com DFA e BZ.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 5- Parasitemia de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do Trypanosoma cruzi e tratados com BZ.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 6- Eritrograma e plaquetas (média± desvio padrão).....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 7- Leucograma (média± desvio padrão).....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 8- Avaliação cinética da viabilidade (% de parasitos viáveis não marcados por trypan blue) das formas tripomastigotas cultivadas na presença de DFA e/ou BZ (média± desvio padrão).</i>	<i>66</i>

- BFA - Brefeldina A
- BZ - Benzonidazol
- C - Camundongos não infectados e não tratados
- CDFA - Camundongos não infectados e tratados com DFA
- CTLF - Capacidade total de ligação de ferro
- DAI - Dia após a infecção
- DC - doença de Chagas
- DFA - Desferrioxamina
- DMEM - *Dulbecco's Modified Medium* (Meio de cultura celular)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPMP - Dia do pico máximo de parasitemia
- EDTA - Ácido etilendiminotetraacético sal dissódico
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- FL1 - Canal para leitura da Fluorescência do tipo 1 (FITC)
- FL2 - Canal para leitura da Fluorescência do tipo 2 (PE)
- I - Camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e não tratados
- IBZ - Camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com BZ
- IDFA/BZ- Camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA e BZ
- IDFA - Camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA
- IFN- γ - Interferon gamma
- IL-10 - Interleucina - 10
- IL-12 - Interleucina- 12
- IL-4 - Interleucina – 4
- IL-6 - Interleucina – 6
- iNOS - Enzima óxido nítrico sintase induzível
- NK - Células Natural Killer
- NO - Óxido Nítrico
- PBS - Tampão Fosfato Salínico
- PBS-P - Tampão Fosfato Salínico com 0,5% de BSA e 0,5% de saponina
- PBS-W - Tampão Fosfato Salínico com 0,5% de BSA
- PI - Iodeto de propídeo
- PMP - Pico máximo de parasitemia
- PP - Período patente
- PPP - Período pré-patente

SBF - Soro fetal bovino

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-alfa

A desferroxamina (DFA) é um quelante de ferro, que também é conhecida por modular a inflamação e atuar como um antioxidante eficaz em condições normais e sob estresse oxidativo. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado a eficácia da DFA no tratamento de infecções por vírus, bactérias e protozoários. A DFA é conhecida por reduzir a intensidade das infecções por *Trypanosoma cruzi* em camundongos, mesmo durante um curso de terapia que não é suficiente para a indução de anemia ou ferropenia. Para esclarecer esses achados, foi investigada a ação da DFA na infecção experimental pelo *T. cruzi* e no suposto efeito direto sobre os parasitos. Animais infectados e tratados com DFA (5mg/animal/dia) por 35 dias, começando 14 dias antes da infecção, apresentaram menores taxas de parasitemia e mortalidade. Também em teste rápido *in vivo*, a DFA foi capaz de reduzir a parasitemia. Não foi observado efeito significativo sobre os marcadores do metabolismo do ferro, eritrograma, plaquetas e leucograma. O esquema de utilização da DFA (5mg/dia, 35 dias), na presença de infecção ou não, não alterou o percentual de células NK⁺, CD19⁺, CD4⁺ ou CD8⁺ esplênicas, mas, na vigência de infecção, estimulou a produção de TNF- α por células NK e de IL-10 por células NK e CD4⁺, caracterizando um efeito misto que combina ações inflamatórias e anti-inflamatórias.

Em relação ao seu impacto direto sobre os parasitos, a DFA inibiu o crescimento de amastigotas e tripomastigotas em cultura de fibroblastos e diminuição na motilidade do parasito. A DFA não afetou a viabilidade avaliada pelo trypan blue e induziu discreta apoptose em tripomastigotas.

Em conclusão, o efeito terapêutico da DFA sobre a infecção experimental pelo *T. cruzi* envolve mecanismos parasitológicos, preferencialmente tripanostáticos, e mecanismos sistêmicos, através da indução de um ambiente de citocinas favorável ao hospedeiro, e é independente da instalação de ferropenia e, assim, livre de efeitos hematológicos significativos.

Desferrioxamine (DFA) is a potent iron chelator that is also known to modulate inflammation and act as an efficient antioxidant under normal conditions and under oxidative stress. Many *in vitro* and *in vivo* studies have shown the efficacy of DFA in the treatment of viral, bacterial and protozoan infections. DFA is known to reduce the intensity of *Trypanosoma cruzi* infections in mice even during a course of therapy that is not effective in maintaining anaemia or low iron levels. To further clarify these findings, we investigated the action of DFA on mouse *T. cruzi* infection outcomes and the supposed direct impact of DFA on parasites.

Infected animals treated with DFA (5 mg/animal/day) for 35 days, beginning 14 days prior to infection, presented lower parasitemia and lower cumulative mortality rate. Also in the rapid test *in vivo*, DFA was able to reduce parasitemia. No significant effect was observed on iron metabolism markers, erythrograms, leukograms.

The treatment regimen of DFA, in the presence of infection or not, did not alter the percentage of NK⁺, CD19⁺, CD4⁺ or CD8⁺ spleen cells, but in the presence of infection, stimulated the production of TNF- α by NK cells and IL-10 by NK cells and CD4⁺, featuring a mixed effect which combines inflammatory and anti-inflammatory properties.

In relation to its direct impact on parasites, DFA inhibited the growth of amastigotes and trypomastigotes in fibroblast culture and decreased in parasite mobility. The DFA did not affect the viability assessed by trypan blue and induced discrete apoptosis in trypomastigotes.

In conclusion, the therapeutic effect of DFA in the experimental *T. cruzi* infection involves parasitological mechanisms preferably trypanostatic and systemic mechanisms, by inducing a cytokine environment favorable to host and it is independent of the installation of iron deficiency and thus free of significant hematological effects.

1.1- Aspectos Gerais da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), importante causa de doença cardíaca na América Latina, é o resultado da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). O ano de 2009 marcou o 100º aniversário da descoberta desta doença que leva o nome do seu agente causador e do médico que primeiro a descreveu (TANOWITZ *et al.*, 2009).

A distribuição geográfica da DC, que inclui seus reservatórios e vetores, estende-se do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e do Chile. Estima-se que 75 a 90 milhões de pessoas nestas regiões estão expostas à infecção enquanto 15 a 16 milhões estão infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina (COURA & DIAS, 2009).

No Brasil, a prevalência da DC humana abrange uma área de três milhões de quilômetros quadrados, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul. São cerca de 2.450 municípios, envolvendo uma população de mais de 28 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação e uma população de aproximadamente três milhões de indivíduos infectados (DIAS, 2007).

A infecção da DC é classicamente considerada como sendo de área rural. Entretanto, o panorama atual mostra aumento dos casos de infecção também nos grandes centros urbanos, podendo estar relacionado a dois principais fatores: (1) a migração de pessoas contaminadas com o *T. cruzi* das áreas rurais para as cidades, com o conseqüente aumento do percentual de portadores da doença em áreas não endêmicas; (2) o transporte do vetor junto aos pertences pessoais, durante o êxodo, favorecendo a formação de um ciclo urbano, uma vez que o vetor é capaz de se adaptar a novos ambientes (CARRASCO *et al.*, 1990, DIAS, 2007).

A principal forma de controle da doença faz-se através de ações de combate químico sistemático aos insetos vetores e ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue. No final do último século, ficou comprovado que medidas sistemáticas de controle e vigilância epidemiológica, em áreas endêmicas, podem levar à eliminação da maioria das populações de vetores domésticos, contribuindo para a interrupção da transmissão da doença. O impacto social do controle da doença pode agora ser demonstrado pela redução ou até mesmo o desaparecimento de casos agudos e de novas infecções em indivíduos mais jovens (DIAS *et al.*, 2002). Apesar do progresso das últimas décadas, em algumas áreas endêmicas, a transmissão vetorial da DC ainda permanece, principalmente, onde a vigilância epidemiológica e o controle da doença são incipientes.

O estado de Minas Gerais, que desde a descoberta da doença, tornou-se importante centro de investigações, teve como cenário o desaparecimento do vetor *Triatoma infestans* e a não documentação de indivíduos menores de dez anos infectados pelo *T. cruzi*. Entretanto, com a descontinuidade dos programas de vigilância epidemiológica, estudos atuais vêm constatando o ressurgimento de novos casos de infecção pelo *T. cruzi* em crianças com idade inferior a 10 anos. Estes dados chamam a atenção para a importância de se adotar medidas de vigilância e controle vetorial sistêmicas. Além disso, é importante salientar que não basta somente o controle do surgimento de novos casos da doença. No Brasil, são cerca de 3 milhões de indivíduos infectados que correspondem a uma sobrecarga para os órgãos de saúde pública e de previdência social, uma vez que a enfermidade ameaça e acomete basicamente as regiões pobres do país, priorizando populações de baixa expressão política, socialmente excluídas, de origem rural e pouco letradas (DIAS, 2007). Por tudo isso, a atenção aos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* geralmente pressupõe uma ação de Estado, o que gera clara dependência de políticas públicas conseqüentes e continuadas, a fim de minimizar os efeitos deletérios da doença.

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se no hospedeiro invertebrado quando a forma tripomastigota sanguínea é ingerida pelo triatomíneo no momento do seu repasto sangüíneo. No trato digestório, as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas que se multiplicam por fissão binária e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, na porção posterior do tubo digestivo. Estas formas, quando eliminadas junto às fezes e urina, infectam o hospedeiro vertebrado através de mucosas íntegras ou lesões de continuidade na pele. Subseqüentemente, os tripomastigotas penetram por endocitose tanto nas células fagocitárias quanto nas não fagocitárias e completam o seu ciclo biológico. Em seguida, modificam-se em amastigotas, que conseguem escapar do vacúolo parasitófago, para o citoplasma das células hospedeiras. Após cerca de 35 horas, inicia-se um processo de divisão binária que pode durar vários dias, dependendo da característica da cepa de *T. cruzi* e da célula parasitada. Em torno de cinco dias, inicia-se um processo no qual as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas e rompem a célula hospedeira, podendo infectar novas células ou permanecer na corrente sangüínea, e iniciam novo ciclo biológico, quando ingeridas pelo vetor (BRENER 1973, GARCIA *et al.*, 1991). Outros mecanismos de transmissão, alternativos ao vetorial, têm sido descritos e incluem a transfusão sanguínea, a transmissão congênita, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (DIAS, 2000).

O *T. cruzi* é capaz de parasitar diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, células musculares lisas e estriadas, além de fibroblastos (ANDRADE & 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 miótropicas (cepa Be-78). Outros tipos de tropismo têm sido descritos, como por exemplo o neurotropismo (cepa PNM) (BICE & 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 evidente (PRATA, 2001). A parasitemia tende a diminuir após o início da elaboração da resposta imune específica contra o parasito bem como seus antígenos, 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 que passam despercebidos na maioria dos pacientes embora em alguns casos possam 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 (ZHANG & TARLETON, 1999).

A fase 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 (GUARNER *et al.*, 2001).

Na fase crônica, a maioria dos indivíduos permanece assintomático caracterizando a forma indeterminada ou inaparente da doença (TANOWITZ *et al.*, 1992, PRATA, 2001). Nessa fase, o ser humano 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 como ELISA (ensaio imunoenzimático indireto), IFI (imunofluorescência indireta) e HAI (hemaglutinação indireta) ou parasitológicos (hemocultura, xenodiagnóstico e PCR) como demonstrado por Chiari *et al.* (1989), Barreto & Lanni, (1994) e Gomes *et al.* (1998). A forma indeterminada é a mais frequente 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 & 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 concomitantemente caracteriza a forma mista da doença (TANOWITZ *et al.*, 1992, Prata, 2001).

A cepa Y do *T. cruzi* foi isolada por Pereira de Freitas em 1950 e foi estudada por Silva e Nussenzweig (1953). Essa cepa, por apresentar algumas particularidades como a predominância de formas tripomastigotas sangüíneas delgadas, alta 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 causados por essa cepa nesses animais são bastante reprodutíveis, tornando-os ideais para estudos experimentais (PINTO *et al.*, 1999).

1.2- Imunopatologia da doença de Chagas

Os aspectos anatomopatológicos das fases da DC são conhecidos e estudados, mas ainda não se sabe como ocorre a mudança de uma fase para outra, o que leva a crer que essa mudança é caracterizada por um processo patológico complexo e pouco entendido.

Logo após a entrada do parasito no tecido inicia-se o recrutamento dos leucócitos para o local da infecção. A migração dessas células depende da produção local de citocinas e quimiocinas, do aumento da expressão dos seus receptores e das moléculas de adesão.

As células NK parecem ter um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, tendo sido demonstrado que durante a infecção ocorre aumento precoce na atividade das mesmas (HATCHER & KUHN, 1982). Cardillo *et al.* (1996) observaram que nos estágios iniciais da infecção, as células NK, através da produção de IFN- γ , promoveriam a ativação de macrófagos para a destruição intracelular do parasito. Assim, as células NK seriam as principais produtoras de IFN- γ nesta fase da infecção (GALVÃO DA SILVA & DE ALMEIDA ABRAHAMSON, 2001). Além disso, as células NK representam uma importante ponte entre a imunidade inata, que opera com limitada especificidade e eficiência, e a imunidade específica, caracterizada pela expansão de linfócitos específicos para os antígenos de *T. cruzi*.

Os macrófagos também têm papel essencial no controle da infecção. Essas células secretam uma variedade de mediadores químicos e citocinas que regulam diferentes compartimentos do sistema imunológico. Eles capturam, processam e apresentam antígenos para as células T e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação destas

células. Entretanto, elas podem desempenhar um papel duplo na infecção pelo *T. cruzi*, ora servindo como células efectoras da resposta imune frente ao parasito, ora como células hospedeiras responsáveis pela multiplicação e diferenciação do mesmo (NOGUEIRA *et al.*, 1982). A ativação dos macrófagos representa um evento relevante da imunidade inata na resistência à infecção pelo *T. cruzi*. O processo de fagocitose mediado por macrófagos é capaz de ativar a produção de uma série de citocinas inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- α , que contribuem para produção de IFN- γ por células NK. A produção de IFN- γ leva a redução da parasitemia e mortalidade, promovendo a estimulação de macrófagos e a produção de metabólitos tóxicos para o parasito (HOLSCHER *et al.*, 1998). Além disso, a regulação da expressão de quimiocinas e de IFN- γ associados à redução do parasitismo tecidual pode ser responsável pelo controle da inflamação e imunopatogenia observados nos tecidos cardíacos na infecção experimental pelo *T. cruzi* (TALVANI *et al.*, 2000).

Além de tipos celulares clássicos da imunidade inata, vários autores relatam que os cardiomiócitos estão ativamente integrados na resposta inflamatória durante a infecção pelo *T. cruzi*, liberando óxido nítrico (NO), citocinas e quimiocinas, que, por sua vez, poderiam atrair os leucócitos inflamatórios para o controle local da replicação intracelular do parasito. Foi demonstrado que o tecido cardíaco de ratos infectados pelo *T. cruzi* expressam IL-6, IL-10, TNF- α e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CHANDRASEKAR *et al.*, 1998). Corações de camundongos infectados pelo *T. cruzi* também apresentaram mRNA da enzima iNOS e de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG & TARLETON, 1996).

O papel das subpopulações de linfócitos T é extremamente discutido, tanto nos mecanismos imunorregulatórios quanto na gênese das lesões resultantes da infecção experimental ou humana pelo *T. cruzi*.

O papel fundamental dos linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção já foi observado por vários estudos que demonstraram que camundongos *knock-out* para as células CD8⁺ não foram capazes de sobreviver à infecção (TARLETON *et al.*, 1994). Células T CD8⁺ constituem a população celular em maior número no processo inflamatório no tecido cardíaco de pacientes portadores da DC crônicos com cardiomiopatia (HIGUCHI *et al.*, 1997). A reação inflamatória depende de linfócitos T sensibilizados tendo em vista que em camundongos atímicos infectados pelo *T. cruzi*, a despeito de um intenso parasitismo tecidual, não apresentam resposta inflamatória cardíaca (GONÇALVES-DA-COSTA *et al.*, 1984). Baseado nessas observações sugere-se que mesmo a miocardite da fase aguda é dependente de linfócitos T sensibilizados contra antígenos do *T. cruzi* (RIBEIRO DOS SANTOS & ROSSI, 1985). Considerando o papel funcional dos linfócitos T CD8⁺ no infiltrado inflamatório

cardíaco, há uma correlação positiva entre o número de células expressando IFN- γ e as células T CD8⁺ em pacientes portadores da DC que apresentaram sucesso no controle do parasitismo (REIS *et al.*, 1997). Além disso, o papel das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no controle da infecção pelo *T. cruzi* tem sido demonstrado em modelos experimentais (MARTIN & TARLETON, 2004, TZELEPIS *et al.*, 2007).

Silverio *et al.* (2010) demonstraram que camundongos *knock-out* para linfócitos T CD8⁺ expressando perforina tiveram menores lesões e disfunções cardíacas. Além disso, outros autores também observaram que células T CD8⁺ de lesões cardíacas e digestivas expressam moléculas citolíticas, como a Granzima A (HIGUCHI *et al.*, 1997, DA SILVEIRA *et al.*, 2007). Deste modo, essas células também seriam responsáveis por dano aos cardiomiócitos, favorecendo o desenvolvimento de lesões nesse tecido.

Células T CD8⁺ específicas para o *T. cruzi* proliferam na ausência de células T CD4⁺ e desempenham função similar a elas, porém os linfócitos CD8⁺ falham em conter a parasitemia e o parasitismo tecidual (PADILLA *et al.*, 2007). Alguns estudos têm confirmado que a deficiência de células CD4⁺ leva a uma redução global da resposta imunológica do hospedeiro e conseqüente aumento de parasitismo tecidual, provavelmente porque linfócitos T CD4⁺ promovem a ativação de macrófagos e a proliferação de linfócitos T CD8⁺ e B (ROTTENBERG *et al.*, 1995, GONÇALVES DA COSTA *et al.*, 2002).

Evidências experimentais indicam que durante a infecção pelo *T. cruzi*, existe uma redução da resposta proliferativa de linfócitos, relacionada ao aumento da taxa de apoptose de linfócitos T CD4⁺ (LOPES *et al.*, 1999). A possibilidade de que o *T. cruzi* utilize a ativação preferencial da resposta do tipo 2 como mecanismo de escape já foi sugerida, contribuindo desta forma para um desequilíbrio das subpopulações de linfócitos T auxiliares (CUNHANETO *et al.*, 1995).

A infecção de camundongos pelo *T. cruzi*, resulta na ativação policlonal de células B durante a fase aguda da infecção (MINOPRIO *et al.*, 1989) e essas células são importantes na ativação de linfócitos T. Cardillo *et al.* (2007) demonstraram a participação dos linfócitos B na regulação do padrão da resposta imune por células T durante a infecção pelo *T. cruzi*. Os autores observaram que camundongos *knock-out* para células B apresentavam menores quantidades de citocinas inflamatórias e menores porcentagens de células T CD8⁺ ativadas e de memória no infiltrado inflamatório cardíaco em relação a camundongos selvagens. A ausência de células B está ainda associada à menor capacidade de mobilização de células inflamatórias para os tecidos infectados, provavelmente resultando no aumento do parasitismo

tecidual, sugerindo deste modo que as células B modulam os linfócitos T para uma resposta do tipo 1 durante a fase aguda da infecção.

As citocinas também participam no controle da replicação do parasito e na resposta imune em animais infectados. Na DC, dados da literatura demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção e são produzidas em níveis elevados na fase crônica, possivelmente pela exposição ao parasito por um longo período (RIBEIRÃO *et al.*, 2000, ABEL *et al.*, 2001, FERREIRA *et al.*, 2003). As citocinas IFN- γ e IL-10 foram dosadas em animais susceptíveis e resistentes à infecção com as cepas Tulahuen, CL e Brasil, sendo observado que a produção de IFN- γ foi similar entre as linhagens resistentes e susceptíveis. No entanto, a produção de IL-10 foi maior nos animais susceptíveis, infectados com as cepas Tulahuen e CL (REED *et al.*, 1994, MINOPRIO *et al.*, 1993) e nos animais resistentes infectados com a cepa Brasil (ZHANG & TARLETON, 1996). Estes estudos mostraram que em animais infectados com o *T. cruzi*, não ocorre uma resposta polarizada, com padrão de produção de citocinas do tipo 1 ou tipo 2. Sugere-se um mecanismo alternativo de regulação, em que a IL-10 bloqueia a estimulação das células NK e a diferenciação do perfil 0 para o perfil 1, favorecendo a predominância da resposta tipo 2.

O IFN- γ é uma citocina que tem sido citada em diferentes modelos experimentais como um dos principais fatores envolvidos na destruição do parasito. Em modelo experimental utilizando C57BL/6, foi observado aumento de IFN- γ sérico no início da infecção, sendo a citocina predominante do décimo quinto ao trigésimo dia, enquanto que, após 60 dias, há inversão no balanço entre perfil inflamatório 1 e 2, em favor do tipo 2 com a produção de IL-4 e IL-10. Animais resistentes à infecção utilizam-se inicialmente das citocinas do perfil 1, com as citocinas do perfil 2 aparecendo em um momento mais tardio (TALVANI *et al.*, 2000).

Existe também uma variação na produção de IFN- γ em diferentes modelos murinos relacionada à resistência que estes animais apresentam à infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos BALB/c infectados com cepa Talahuén do *T. cruzi* apresentam parasitemia precoce. As células do baço destes animais liberam IFN- γ na segunda semana de infecção, enquanto que camundongos C3H/He, resistentes à infecção, produzem IFN- γ dois dias após serem infectados (ANTÚNEZ & CARDONI, 2001).

Diversas outras alterações do sistema imune são observadas durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Nos órgãos linfóides secundários, alguns autores têm relatado esplenomegalia e linfadenopatia, com ativação policlonal persistente de linfócitos T e B (BRENER & GAZINELLI, 1997, MINOPRIO, 2001). Além disso, linfócitos T ativados de

baço de camundongos infectados pelo *T. cruzi* secretam IFN- γ , IL-4 e IL-10, sugerindo um perfil misto (tipo 1 e tipo 2) de produção de citocinas neste órgão (SILVA *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos em humanos demonstraram que a alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ e TNF- α , está associada também com a progressão da gravidade da lesão cardíaca (GOMES *et al.*, 2003, TALVANI *et al.*, 2004). Entretanto, estudos realizados por Laucella *et al.* (2004) indicaram uma correlação negativa entre a expressão de IFN- γ e a cardiomiopatia. Deste modo, a participação do IFN- γ no desenvolvimento da lesão cardíaca ainda é controversa. Por outro lado, dados da literatura demonstram que monócitos de pacientes com a forma indeterminada apresentam maior expressão da citocina IL-10 após exposição ao parasito, enquanto que monócitos de pacientes portadores da forma cardíaca submetidos ao mesmo tratamento expressam, preferencialmente, TNF- α (SOUZA *et al.*, 2004). Outros autores também observaram a alta expressão de IL-10 por células de pacientes com a forma indeterminada (GOMES *et al.*, 2003). Assim, pode-se especular que indivíduos que permanecem assintomáticos são capazes de reduzir o número de parasitos no início da infecção, regulando a resposta imune e limitando o desenvolvimento das lesões. Por outro lado, indivíduos que desenvolverão a forma cardíaca, apesar de conseguirem controlar o parasitismo, não são capazes de produzir uma resposta imunoreguladora, o que possibilita o estabelecimento de uma inflamação persistente.

1.3- Tratamento etiológico da doença de Chagas

O Benzonidazol - BZ (LAFEPE, Pernambuco, Brasil) é o único fármaco com ação tripanomicida empregado, atualmente, no Brasil e apresenta eficácia limitada (CANÇADO, 2002).

O BZ e o Nifurtimox (Lampit[®], Bayer) têm sido utilizados para o tratamento da DC por mais de 40 anos. O tempo de tratamento em casos humanos varia de 1-4 meses para o Nifurtimox e de 1-2 meses para o BZ (revisado por RASSI *et al.*, 2010). Entretanto, devido à sua conhecida toxicidade e seu efeito limitado com relação aos diferentes isolados do parasito e as fases da doença (principalmente pacientes na fase crônica tardia), a busca por novos fármacos se faz necessária (COURA & DE CASTRO, 2002, SOEIRO & DE CASTRO, 2009).

O BZ reduz a duração e a gravidade clínica da fase aguda e congênita da infecção pelo *T. cruzi*, atingindo um índice de cura de somente 50% dos pacientes. Além disso, esta droga exibe baixa eficácia no tratamento durante a fase crônica da doença (revisado por RASSI *et al.*, 2010). No modelo murino a eficácia do tratamento varia de acordo com as cepas do *T. cruzi*, e, em geral, a quimioterapia é mais eficiente durante a fase aguda da infecção (FILARDI & BRENER, 1987).

Os efeitos colaterais provocados pelo BZ podem ser agrupados de três formas: (i) manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea (usualmente entre o 7^o e 10^o dia de tratamento), edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares; (ii) depressão da medula óssea, incluindo neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; e (iii) polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite (CASTRO *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação preciso deste fármaco nitro-heterocíclico nos tripanosomas não foi totalmente esclarecido, por isso duas hipóteses foram propostas. A primeira resultou da observação que a ativação de cada um dos fármacos poderia levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DOCAMPO, 1990) e a segunda se deu através de reações bioquímicas que levaram à ruptura do DNA do parasito (WILKINSON & KELLY, 2009).

Outro trabalho que poderia explicar o mecanismo de ação do BZ foi realizado por Turrens *et al.* (1996) que mostraram que o BZ é um potente inibidor da enzima NADH-fumarato redutase, importante para a produção de energia nos tripanosomatídeos e presente em todos os estágios evolutivos do *T. cruzi*. Foi observada uma forte correlação entre a inibição de crescimento de formas epimastigostas em cultura celular e a inibição dessa

enzima *in vitro*. Apesar dessa enzima não ser o alvo primário desse fármaco, a inibição parcial da mesma poderia afetar a produção de succinato (o principal substrato respiratório) contribuindo para sua ação tóxica em células vivas.

Em uma ampla revisão da literatura Toledo *et al.* (2004) demonstraram que das 104 cepas do parasito estudadas até então, 58,5% foram susceptíveis aos derivados nitro-heterocíclicos, 5,77% parcialmente sensíveis e 35,8% foram resistentes. Embora a existência de cepas naturalmente resistentes aos derivados nitro-herocíclicos seja um fator importante influenciando a resposta ao tratamento (FILARDI & 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 indica também associação com a resposta imune. Alguns trabalhos corroboram com essa observação, uma vez que demonstraram que o tratamento com derivados nitro-heterocíclicos 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 nitro-heterocíclicos 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 nitro-heterocíclicos 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 tipo selvagem (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 aumento na ativação do macrófago. O aumento de NO e citocinas têm efeito direto no aumento da fagocitose de parasitos WT obtidos após tratamento *in vivo* com BZ. 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).

Trabalhos posteriores mostraram que camundongos IFN- γ *knock-out* infectados com a cepa Y apresentaram 100% de mortalidade 45 dias após o fim do tratamento com BZ e 0% de

cura parasitológica. O mecanismo principal pelo qual o IFN- γ aumenta o efeito tripanocida do BZ não é conhecido e merece investigações posteriores (ROMANHA *et al.*, 2002).

1.4- Status nutricional na infecção pelo *T. cruzi* e desferrioxamina (DFA)

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta diversidade morfológica, imunológica e patogênica, que dependem do hospedeiro e outros fatores ainda indeterminados, bem como das variações regionais e individuais da doença humana e da infecção natural e experimental (COURA & DIAS, 2009). Diversos estudos têm demonstrado a natureza multifatorial dos mecanismos envolvidos no estabelecimento das diferentes formas clínicas da doença, bem como nos aspectos inerentes à resposta quimioterápica. Destacam-se, nesse contexto, aspectos inerentes tanto ao parasito quanto ao hospedeiro (MACEDO, 2004).

Dentre os aspectos inerentes ao parasito, a presença de populações geneticamente distintas vem sendo sugerida como fator determinante (VAGO *et al.*, 2000, MACEDO, 2004, TOLEDO *et al.*, 2003). No âmbito do hospedeiro, o estado nutricional e o padrão de resposta imune têm sido apontados como os principais fatores determinantes das diferentes formas clínicas e da eficácia terapêutica (RIVERA *et al.*, 2003).

Alguns estudos têm provado que diversos micronutrientes, que incluem o zinco, ferro (Fe) e selênio podem influenciar no perfil da resposta imune e, conseqüentemente, determinar a susceptibilidade do hospedeiro a infecções. A deficiência de micronutrientes no organismo pode ser induzida por diversos fatores, tais como dietas deficientes, infecções parasitárias ou uso terapêutico de agentes quelantes. Em geral, tais deficiências possuem efeitos amplos sobre quase todos os componentes da resposta imune inata e adaptativa (RIVERA *et al.*, 2003, THIBAUT *et al.*, 1993, KENT *et al.*, 1990, LETENDRE, 1985, BALIGA *et al.*, 1982). Além disso, muitos agentes infecciosos dependem do estado nutricional do hospedeiro para sua própria sobrevivência. Portanto, frente a uma oferta reduzida de micronutrientes, eles têm sua proliferação diminuída o que origina uma infecção atenuada no hospedeiro.

É importante ressaltar que as deficiências de micronutrientes e doenças infectoparasitárias coexistem em diversas regiões do globo e, frequentemente, apresentam interações complexas, que promovem efeitos clínicos deletérios e mutuamente reforçados. Tais combinações são predominantemente observadas em países em desenvolvimento e, particularmente em regiões rurais. Cabe destacar que o significado de tais efeitos sinérgicos depende do estado nutricional prévio do indivíduo, da natureza e duração da infecção, bem como da dieta durante o período de recuperação (SCRIMSHAW & SANGIOVANNI, 1997).

A infecção pelo *T. cruzi* representa um protótipo de tal particularidade das doenças infectoparasitárias, que ocorrem preferencialmente entre populações pobres, residentes em

áreas rurais da América Central e do Sul, onde a desnutrição poderia representar um cofator de impacto sobre o curso da infecção, bem como na resposta terapêutica ao BZ. A desnutrição é frequente em áreas endêmicas para DC (ANDRADE & ZICKER, 1995).

Fatores nutricionais provocam alterações na resposta imune, afetam o desenvolvimento de infecções e a gravidade das doenças (BEHARKA *et al.*, 1997). Alguns estudos têm sido realizados para esclarecer o efeito da nutrição na infecção humana e experimental pelo *T. cruzi* (DE ANDRADE & ZICKER, 1995, BARROS *et al.*, 2002). Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, a deficiência em zinco parece interagir sinergicamente, alterando o perfil imunológico do hospedeiro, o que favorece o desenvolvimento do parasito, e promove a exacerbação das taxas de parasitemia e mortalidade nos animais infectados (FRAKER *et al.*, 1982).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado a importância da deficiência de Fe no controle de aspectos parasitológicos em modelos experimentais infectados com o *T. cruzi* (LALONDE & HOLBEIN, 1984, PEDROSA *et al.*, 1990). O Fe possui um papel central na biologia. Ele é um cofator indispensável para enzimas envolvidas na proliferação celular, respiração, metabolismo de folato e síntese de DNA. Contudo, o excesso de Fe “livre” é tóxico. O Fe em sua forma ferrosa participa da reação de Fenton com o objetivo de catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil altamente reativos que danificam o DNA, proteínas e lipídios. Diversas doenças resultam do desequilíbrio na homeostase desse mineral. Um delicado balanço de Fe corporal é necessário para a resistência à infecção. Embora os hospedeiros tenham desenvolvido contramedidas para limitar a disponibilidade de Fe para o patógeno, é necessário assegurar que o Fe disponível é suficiente para manter as funções celulares essenciais, incluindo a defesa antimicrobiana (FALZACAPP & MUCKENTHALER, 2005).

É sabido que a manutenção da homeostase celular de Fe não é somente um requerimento geral para o crescimento e proliferação de todas as células, mas é também de extrema importância para a regulação da resposta imune. A sua deficiência predispõe o hospedeiro a infecções por interferir tanto na resposta celular quanto humoral (WEINBERG, 1984, GALAN *et al.*, 1988, BLAKLEY & HAMILTON, 1988, KENT *et al.*, 1990). As deficiências no status de Fe também são conhecidas por prejudicarem a função das células do sistema imune, especialmente dos linfócitos (BALIGA *et al.*, 1982). O Fe modula a expressão de moléculas de superfície de células T, função fagocítica de macrófagos (JIANG *et al.*, 1993) e a atividade de células natural killers (NK) (NISHIYA *et al.*, 1982). Além

disso, o Fe diminui o IFN- γ em células mielomonocíticas humanas (WEISS *et al.*, 1992) e reduz a produção de NO em células microgliais murinas (SALEPPICO *et al.*, 1996).

O mecanismo de controle da homeostase de Fe acontece em nível celular e sistêmico. O controle celular envolve a absorção, armazenamento, exportação e distribuição intracelular de Fe. Já a homeostase sistêmica de Fe regula a entrada e mobilização dos estoques (principalmente no fígado) para sustentar a demanda da eritropoiese. Eritrócitos senescentes são reciclados, predominantemente no baço, através do sistema macrofágico-monocítico em Fe livre para um posterior ciclo de eritropoieses. Não há caminho fisiológico para a excreção ativa de Fe do corpo. A perda de sangue e as células da mucosa intestinal são responsáveis pela maior parte do Fe que deixa o organismo e a absorção do Fe da dieta compensa essas perdas. Para manter a homeostase sistêmica, a comunicação entre as células que consomem Fe (principalmente precursores eritróides), os estoques de Fe (hepatócitos e macrófagos) e a absorção de Fe da dieta (enterócitos do duodeno), deve ser fortemente regulada (FALZACAPP & MUCKENTHALER, 2005).

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). Lima & Villalta (1989), em trabalhos relacionados a receptores do *T. cruzi* para a transferrina humana e o seu papel, mostraram que as formas amastigotas apresentam receptores para esta proteína. O Fe é essencial para o crescimento desta forma parasitária e é obtido através da endocitose de transferrina mediada por receptores.

Os primeiros trabalhos correlacionando o *T. cruzi* com as alterações nos níveis de Fe e infecção foram realizados por Lalonde & Holbein (1984) e por Loo & 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 Fe aumentados pela injeção de Fe-dextran (5 mg, 5 dias após a infecção) apresentaram maior mortalidade.

Os autores também avaliaram a ação de quelante de Fe, Desferrioxamina (DFA - Desferal[®], Basel, Suíça) e demonstraram que a exaustão dos estoques de Fe do hospedeiro, induzida pelo tratamento com DFA (10 mg/ 5^o e 6^o dpi) ou por dieta deficiente de Fe, reduzia a patogenicidade.

Estudos posteriores também avaliaram os efeitos da deficiência ou suplementação de Fe, assim como do uso de DFA, na evolução da infecção experimental por diferentes cepas do *T. cruzi* (PEDROSA *et al.*, 1990). Os resultados variaram de acordo com a cepa utilizada: cepa Y e CL (1.400 formas sanguíneas) e cepa YuYu (15.000 formas sanguíneas). O tratamento com Fe-dextran (5 mg/5^o dpi) resultou em maior parasitemia e mortalidade na infecção pela cepa Y, maior parasitemia na infecção pela cepa CL e nenhum efeito na infecção pela cepa YuYu. O tratamento com a DFA (10mg/5^o dpi) não provocou alteração na infecção pelas cepas Y e CL e uma infecção branda pela 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*.

A DFA é isolada como quelato de ferro a partir de *Streptomyces pylosis* que é tratado quimicamente para se obter o quelante livre do metal. Este fármaco tem as propriedades desejáveis de grande afinidade com o íon férrico ($k_a = 10^{31}$) e pouquíssima afinidade pelo cálcio ($k_a = 10^2$). A DFA é um quelante hexadentato com alta afinidade pelo ferro, resultando em um complexo 1:1 (KEBERLE, 1964). Este agente é 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 uso clínico indicado por sua capacidade em acessar os estoques de Fe no fígado e no sistema macrofágico-monocítico, que armazenam uma parcela significativa do Fe corporal. No entanto, devido à lenta penetração nas células por causa do seu alto peso molecular e hidrofobicidade, a sua eficiência como quelante intracelular é limitada (KEBERLE 1964, ZANNINELI *et al.*, 1997). Esse quelante de Fe tem sido empregado 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 foram propostos pelos autores para a ação do fármaco durante a infecção: indução da deficiência de ferro por limitar sua disponibilidade dentro da célula ou interferência direta com a aquisição de ferro pelo parasito (HERSHKO & PETO, 1988).

Resultados prévios observados pelo nosso grupo (ARANTES *et al.*, 2007, FRANCISCO *et al.*, 2008) demonstraram que, no âmbito da interação *T. cruzi*/hospedeiro no modelo murino, a utilização da DFA representa um fator favorável ao hospedeiro, com redução da

parasitemia e mortalidade, apesar das dosagens de ferro sérico e de hemoglobina não terem sofrido diminuição em seus níveis (ARANTES *et al.*, 2007).

Pesquisas posteriores, desenvolvidas pelo mesmo grupo descreveram que a associação da DFA ao fármaco BZ promoveu 100% de sobrevivência em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, sugerindo que a utilização deste quelante também interfere na resposta quimioterápica. Em relação ao parasitismo tecidual, o tratamento com DFA não reduziu o parasitismo cardíaco e hepático; porém, no baço a redução do parasitismo foi mais evidente nos grupos em que os dois fármacos estiveram associados. Estes autores ainda mostraram que as concentrações de ferro sérico foram maiores nos animais tratados com DFA ou com a associação DFA/BZ comparado ao grupo infectado (FRANCISCO *et al.*, 2008).

Recentemente, demonstrou-se que a DFA aumenta a atividade antioxidante no hospedeiro murino, mas também eleva o estresse oxidativo que exerce pressão sobre o parasito. Isto sugere que a DFA oferece um balanço dos efeitos no que diz respeito à sua capacidade de promover a proteção do hospedeiro. As diferenças entre o parasita e o hospedeiro em termos de sistemas bioquímicos na defesa antioxidante poderiam fornecer alvos para o desenvolvimento de uma quimioterapia efetiva para a doença de Chagas. (FRANCISCO *et al.*, 2010). Esta nova descoberta em relação ao *T. cruzi* e DFA é de extrema importância para ajudar a elucidar o modo de ação deste fármaco durante a infecção.

Diante dos resultados encontrados por nosso grupo (ARANTES *et al.*, 2007, FRANCISCO *et al.*, 2008, 2010) podemos supor que este fármaco pode ter outros mecanismos de ação, independente do distúrbio do metabolismo de Fe do hospedeiro.

Apesar da clara evidência que a DFA seja capaz de reduzir a intensidade da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos, o mecanismo deste efeito ainda não está claro e pode envolver diferentes mecanismos.

Considerando a complexa rede desencadeada durante a infecção pelo *T. cruzi*, diversos fatores, relacionados ao parasito ou inerentes ao hospedeiro, poderiam estar associados com diferentes resultados no curso da doença após o tratamento com a DFA.

Com o objetivo de tentar esclarecer estes fenômenos, investigamos novos parâmetros relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, com o objetivo de esclarecer os mecanismos subjacentes ao impacto da utilização da DFA sobre o curso da infecção pelo *T. cruzi*.

O tratamento da DC ainda não apresenta resultados satisfatórios e atualmente o único fármaco empregado no tratamento humano no Brasil, o BZ, vem sendo utilizado sob estrita supervisão médica. Por isso, o tratamento quimioterápico para essa doença tem sido alvo de muitas pesquisas na busca de novos fármacos mais eficazes no combate do *T. cruzi*. No intuito de compreender melhor o mecanismo de ação desse fármaco, diversos trabalhos têm proposto diferentes mecanismos de ação para o BZ, porém nenhum deles estabelece de forma satisfatória o papel do BZ sobre o parasito. Quelantes têm sido utilizados em estudos que avaliam a relação entre doenças e *status* de ferro. Estudos recentes, realizados pelo nosso grupo demonstram que, no âmbito da interação *Trypanosoma cruzi*/hospedeiro no modelo murino, a utilização da DFA representa um fator favorável ao hospedeiro, com redução da parasitemia e mortalidade.

Diante destes fatos, este trabalho propõe trazer novos esclarecimentos acerca da ação favorável da DFA no curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

3.1- Objetivos gerais

Avaliar a ação da DFA no curso da infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos, considerando aspectos parasitológicos, bioquímicos e imunológicos.

3.2- Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da utilização da DFA no curso da infecção aguda em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* com ênfase na parasitemia e mortalidade;
2. Avaliar os efeitos da utilização da DFA sobre a susceptibilidade do *T. cruzi* pelo teste rápido *in vivo*;
3. Avaliar os efeitos da utilização da DFA em biomarcadores do hospedeiro como hemograma e níveis séricos de ferro (ferritina, ferro sérico e capacidade de ligação de ferro);
4. Avaliar os efeitos da utilização da DFA no perfil fenotípico das células mononucleares (células NK⁺, linfócitos B, células CD4⁺ e CD8⁺) e padrão de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-10) produzidas *in vitro* por células do baço;
5. Avaliar os efeitos da utilização da DFA em parâmetros biológicos do parasito como crescimento em cultura de fibroblastos, viabilidade, motilidade e apoptose;

4 - Animais, materiais e métodos

4.1- Animais utilizados

Para a realização do experimento foi utilizado um total de 128 camundongos suíços machos com aproximadamente 30 dias de idade, pesando entre 20-30g. Estes camundongos foram obtidos e mantidos no biotério de experimentação do Instituto de Pesquisas René Rachou (CPqRR) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), protocolo n°153/2007.

4.2- Delineamento experimental

Os animais (n=128) foram divididos em três grupos: o primeiro utilizado para a avaliação da parasitemia e mortalidade (n=48), o segundo para o teste rápido *in vivo* (20) e o terceiro para avaliação dos parâmetros biológicos (n=60).

Para o estudo de parasitemia e mortalidade, a divisão dos grupos compreendeu: (1) camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e não tratados (I) (n=12), (2) camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA (IDFA) (n=12), (3) camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA e BZ (IDFA/BZ) (n=12) e (4) camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com BZ (IBZ),

Para o teste rápido *in vivo*, (n=20), os animais foram divididos em 4 grupos: (1) controle (sem tratamento), (2) tratados com DFA - 25 mg/animal, (3) tratados com BZ - 500 mg/kg, (4) tratados com BZ (500 mg/kg) e DFA (25 mg/animal). Os animais foram inoculados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.

Para o estudo dos parâmetros biológicos, a divisão dos grupos compreendeu: (1) camundongos não infectados e não tratados (C) (n=15), (2) camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e não tratados (I) (n=15), (3) camundongos não infectados e tratados com DFA (CDFA) (n=15), (4) camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA (IDFA) (n=15).

Para os estudos de parasitemia, mortalidade e dos parâmetros biológicos, a DFA foi ministrada aos animais, por via intraperitoneal, na dose de 5mg/animal/dia por 14 dias antes da infecção e por mais 21 dias pós-infecção. No 14º dia após tratamento ou não, 78 animais foram infectados com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, que é considerada uma cepa parcialmente resistente ao tratamento quimioterápico (FILARDI & BRENER, 1987, VELOSO *et al.*, 2001). Para o tratamento etiológico de fase aguda foi empregado o BZ, por via oral (100mg/kg de peso corporal, (FILARDI & BRENER, 1987),

que foi iniciado no 1^o dia em que foi identificado parasitemia no exame de sangue a fresco (aproximadamente 7 dias após a infecção) e por mais 21 dias de experimento. Os camundongos pertencentes aos grupos CDFA e CDFA/BZ receberam a mesma quantidade do diluente do medicamento (água para injeção). Os camundongos pertencentes aos grupos CBZ e CDFA/BZ receberam a mesma quantidade de água destilada via gavagem.

4.3- Parâmetros avaliados

4.3.1- Parâmetros relacionados à utilização da DFA no curso da infecção e susceptibilidade do *T. cruzi* pelo teste rápido in vivo

4.3.1.1- Curva de parasitemia

Para determinação da parasitemia os camundongos foram avaliados diariamente a partir do 4^o dia após a infecção (DAI) até a negatificação do exame, por cinco 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 nos animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sangüíneos por 0,1mL de sangue e os parâmetros abaixo também foram avaliados:

Período pré-patente (PPP)

O PPP corresponde ao período compreendido entre o inóculo 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 negatificação 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 sangüíneos/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.

4.3.1.2- Taxa de mortalidade

Para determinação da taxa de mortalidade os animais foram acompanhados diariamente até 40 dias após a infecção e a mortalidade registrada, sendo expressa em percentual de mortalidade.

4.3.1.3- Parasitemia pelo teste rápido *in vivo*

Camundongos suíços machos (n=20) foram inoculados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. No dia do pico de parasitemia (7 dias após a infecção), os animais foram divididos em 4 grupos (n=5) e tratados com DFA, BZ ou a associação (DFA + BZ), como apresentado abaixo:

Grupo 1: Controle (sem tratamento)

Grupo 2: Tratados com DFA - 25 mg/animal

Grupo 3: Tratados com BZ - 500 mg/kg

Grupo 4: Tratados com BZ (500 mg/kg) e DFA (25 mg/animal)

O número de parasitos circulantes foi determinado no início do experimento de acordo com Brener (1962) e considerados como o pico máximo de parasitemia (100%)- tempo zero. A parasitemia foi determinada três e 6 horas após a infecção e administração dos fármacos e comparado com o tempo zero para calcular a porcentagem de redução do número de tripomastigotas circulantes (FILARDI & BRENER *et al.*, 1984).

4.3.2- Parâmetros relacionados à utilização da DFA em biomarcadores do hospedeiro

4.3.2.1- Coleta de sangue

Trezentos microlitros de sangue de cada animal de cada grupo foram coletados do plexo orbital no dia do inóculo (0) e no 7^o, 14^o e 21^o DAI.

4.3.2.2- Hemograma

O perfil hematológico do sangue dos camundongos foi determinado no dia do inóculo (0) e no 7^o, 14^o e 21^o DAI utilizando-se o contador hematológico veterinário automático (BC-2800VET, Mindray). Foram avaliadas as séries vermelha (hemácias, hemoglobina) e plaquetas, branca (linfócitos, monócitos e granulócitos) e plaquetas.

4.3.2.3- Avaliação dos níveis de ferro em camundongos

4.3.2.3.1- Dosagem de ferritina

As dosagens de ferritina foram realizadas no soro utilizando-se Kit comercial por ELISA (Mouse Ferritin ELISA Kit, E-90F, Immunology Consultants laboratory).

4.3.2.3.2- Determinação dos níveis de ferro sérico

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

4.3.2.3.3- Capacidade total de ligação do ferro (CTLF)

A CTLF que dosa indiretamente a transferrina foi realizada no soro utilizando-se o kit comercial (Labtest, Cat 41, ANVS: 10009010111, Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.3.2.4- Análise do perfil fenotípico linfocitário do baço e padrão de citocinas produzidas pelas células mononucleares esplênicas

Os animais de cada grupo foram eutanaziados por deslocamento cervical, no dia do inóculo (0) e no 7^o, 14^o e 21^o DAI para a coleta do baço e realização da cultura dos esplenócitos.

4.3.2.4.1- Cultura de células esplênicas

As suspensões de células do baço foram preparadas de acordo com o método descrito por Taylor *et al.* (1987). O órgão foi retirado e colocado em um macerador de tecido de vidro com 10 ml de RPMI. Posteriormente, após a retirada dos *debris*, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 ml e centrifugada a 1200 rpm por 7 minutos.

Alíquotas de células esplênicas (1×10^7 /mL) foram incubadas na presença apenas de meio de cultura RPMI por 12 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Após a retirada dos tubos da estufa, adicionou-se Brefeldina A (BFA) (10 µg/ml, Sigma) com posterior incubação por 4 horas. Utilizou-se a BFA para inibir a secreção da citocina, mantendo-a no interior do complexo de Golgi. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 200µl ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Sigma), numa concentração final de 20mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. O EDTA bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 3 mL de tampão de lavagem – PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1% de azida sódica), e centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos a 18°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS-W. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-moléculas de superfície (CD4, CD8, CD19, CD49b – Tabela 1) por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a etapa da identificação das populações celulares, procedeu-se à lise dos eritrócitos e à fixação dos leucócitos pelo tratamento com 2mL de solução de lise diluída 10 x em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a fixação, a suspensão de leucócitos foi centrifugada a 1200 rpm durante 7 minutos a 18°C, o sobrenadante descartado e as células permeabilizadas com 2mL de solução permeabilizante – PBS-P (PBS-W e 0,5% de saponina – Sigma), por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a permeabilização, as suspensões de leucócitos

foram centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 3mL de PBS-W. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS-W. Após a ressuspensão das células, procedeu-se à marcação das citocinas intracitoplasmáticas em placas de 96 poços e fundo em “U”. Para isso, alíquotas de 30µL das suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz na presença de 20µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE (anti-TNF- α , anti-IFN- γ e anti-IL-10, - Tabela 2) e previamente diluídos a 1:50 em PBS-P estéril com 10% de soro normal de rato. Após a incubação, as células foram lavadas com 100µl de PBS-P e, em seguida, com 200µl de PBS-W. As preparações celulares foram então fixadas em 200µl de solução fixadora e estocadas a 4°C ao abrigo da luz até a sua leitura no citômetro de fluxo em 24 horas.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares.

Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	FITC	Caltag	RM4-5	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Caltag	5H10	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	FITC	Caltag	6D5	Linfócitos B
Anti-CD49b	FITC	Pharmingen	DX5	Células NK

Tabela 2- Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em populações leucocitárias.

Anticorpos	Fabricante	Clone	Concentração
Anti TNF- α PE	Caltag	MP6-XT22	50 μ g/0,5ml
Anti IL-10 PE	Caltag	JES5-2A5	50 μ g/0,5ml
Anti IFN- γ PE	Serotec	XMG1.2	0,1mg/ml

4.3.2.4.2- Análise da produção de citocinas por linfócitos

A análise da produção de citocinas por células NK, linfócitos T e B foi realizada através de análise convencional. A população celular de interesse (R1) (Figura 1A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de populações celulares produtoras de citocinas, dentro de R1, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL2 versus FL1 (Figura 1B).

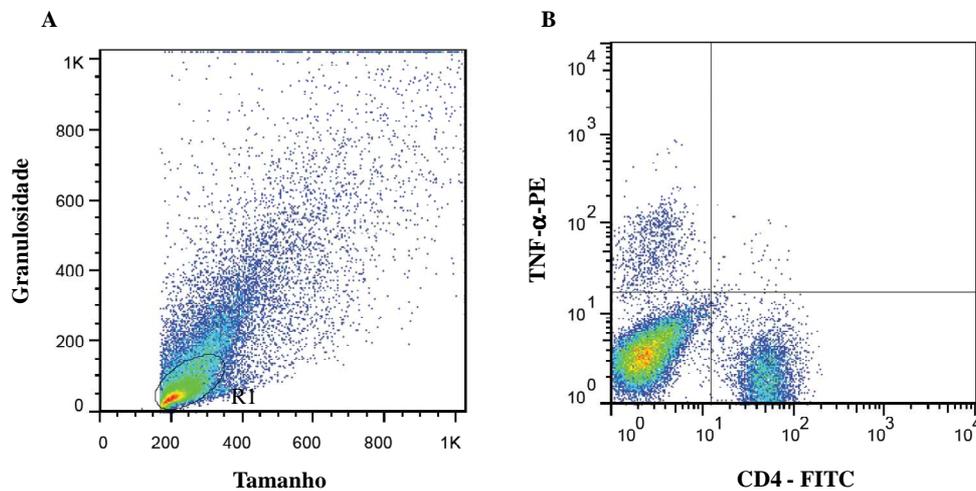


Figura 1- Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por célula $CD4^+$. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R1.

4.3.3- Atividade do fármaco DFA diretamente sobre o *T. cruzi*

4.3.3.1- Avaliação da inibição do crescimento do *T. cruzi* em cultura

4.3.3.1.1- Manutenção das células L929 e da cepa Tulahen do *T. cruzi*

Culturas de células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo, em meio RPMI 1640 sem vermelho e suplementado com SBF 10% e 2mM de glutamina foram semeadas em garrafas de 25cm², 150.000 células/garrafa. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 7 dias.

Para a manutenção da cepa Tulahuen de *T. cruzi* transformada para expressar o gene da β-galactosidase, 150.000 células L929 semeadas em garrafas de 25cm² foram infectadas com as formas tripomastigotas (10 parasitos por célula). Os parasitos que não penetraram nas células foram retirados por lavagem após 24 h e a cultura foi incubada novamente em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 7 dias.

4.3.3.1.2- Ensaio de inibição de crescimento do *T. cruzi*

O ensaio *in vitro* com as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do *T. cruzi* foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Buckner *et al.* (1996) com modificações.

Uma placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células L929 em 80 µl de RPMI por poço. Após incubação “overnight” em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as células foram infectadas com 40.000 formas tripomastigotas do parasito (cepa Tulahuen expressando beta-galactosidase) por poço, diluídos em 20 µL de RPMI. A placa foi incubada por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂ e, após esse período, os parasitos que não penetraram foram retirados por substituição com 200 µL de RPMI por poço. A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas para o estabelecimento da infecção. Após este tempo, o meio de cultura foi trocado por 180 µL de RPMI e 20 µL do composto a ser testado (DFA) em triplicata, em diferentes concentrações (1, 5, 10, 20, 10, 50 e 100 µg/mL). A adição dos fármacos à placa foi realizada da seguinte forma: 180 µl de RPMI foram adicionados em cada poço; a seguir, 20 µL dos compostos solubilizados em água foram adicionados e foi realizada a homogeneização com a pipeta. Adicionalmente foram utilizados os seguintes controles em cada placa: células

não infectadas e sem adição de compostos, células infectadas pelo parasito sem adição de compostos, células infectadas pelo parasito com adição de DMSO a 1% e células infectadas pelo parasito com adição de BZ na concentração de 1 µg/ mL (3,81 µM). Após a adição do fármaco, a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 96 horas. Após esse período, foram adicionados 50 µL por poço do substrato cloro-phenol red beta-D-galactopyranoside (CPRG) 500 µM com nonidet p40 0,5% e a leitura da placa foi realizada 16 a 20 horas após a adição do substrato, em leitor de ELISA com filtro de 570nm. Os resultados foram expressos como inibição do crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e a análise foi realizada considerando-se a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida, promovida pelo composto testado, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasito na ausência de compostos.

4.3.3.2- Ensaios de viabilidade por trypan blue, apoptose e motilidade

4.3.3.2.1- Obtenção das formas trypomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células L929 infectadas pelo *T. cruzi*. As células foram semeadas em frascos de cultura de tecido de 25cm² (Falcon) contendo meio DMEM-5% SBF. Após a adesão e formação da monocamada de células, estas foram infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* na proporção de 10 parasitos/célula. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, 95% de umidade por 24h para favorecer a infecção. Após esse período, as células foram lavadas para retirar os parasitos remanescentes e mantidas com meio DMEM-5% SBF a 33°C, 5% de CO₂, 95% de umidade (BERTELLI *et al.*, 1977). O meio foi trocado diariamente, e a partir do sexto dia de cultura formas tripomastigotas puderam ser coletadas no sobrenadante. Os parasitos foram separados dos restos celulares, por centrifugação diferencial. Inicialmente, a suspensão de parasitos foi centrifugada em tubos cônicos de 50 mL à temperatura ambiente, 100 x g por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. Esse foi coletado e centrifugado a 4°C, 1.000 x g por 10 minutos. Os parasitos foram lavados três vezes em PBS (0,015M pH 7,4) nas condições anteriores. As culturas a 37°C foram empregadas em diferentes condições dependendo dos ensaios utilizados.

4.3.3.2.2- Viabilidade (marcação pelo trypan blue)

As formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do DFA (1, 5, 10, 20, 10, 50 e 100 µg/mL), violeta de genciana (50 µg/mL) ou BZ (1µg/mL) ou associação DFA (1, 5 e 10 µg/mL) + BZ (1µg/mL) por 0.5, 1, 3, 6, 9 e 12 horas a 37°C.

Para a determinação da viabilidade das formas tripomastigotas, 1×10^5 parasitos foram ressuspensos em PBS e incubados com 1µL de trypan blue 0.4% por 10 minutos em temperatura ambiente anteriormente a análise no citômetro de fluxo. Um total de 10.000 eventos foi adquirido e analisados pelo Flow-Jo software. A porcentagem de parasitos viáveis não apresentou nenhuma marcação com o trypan blue. A porcentagem de parasitos viáveis foi definida pelo histograma de marcação pelo trypan blue.

4.3.3.2.3- Marcação com anexina e iodeto de propídeo (PI) – apoptose

As formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do DFA (1, 5, 10, 20, 10, 50 e 100 µg/mL), violeta de genciana (50 µg/mL) ou BZ (1µg/mL) ou associação DFA (1, 5 e 10 µg/mL) + BZ (1µg/mL) por 0.5, 1 e 3 horas a 37°C.

Para este experimento, 1×10^6 parasitos foram ressuspensos em um tampão de ligação enriquecido com Ca^{2+} (Apoptosis Detection Kit, Sigma, USA). A suspensão contendo os parasitos foi marcada duplamente com anexina V conjugada com FITC e PI por 10 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. O material foi analisado imediatamente no citômetro de fluxo. As emissões de anexina V e PI foram detectadas nas emissões FL-1 e FL-2, respectivamente. Os parasitos que não apresentaram marcação com PI ou anexina V foram considerados vivos. Os parasitos marcados somente com anexina V foram considerados no processo inicial de apoptose e os que apresentaram marcação para ambos (PI e anexina) marcadores foram considerados no processo tardio de apoptose. Os parasitos marcados somente com PI foram considerados mortos.

4.3.3.2.4- Ensaio de motilidade

As formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do DFA (1, 5, 10, 20, 10, 50 e 100 µg/mL), violeta de genciana (50 µg/mL) ou BZ (1µg/mL) por 1, 3, 6, 9 ou 12 horas a 37°C.

Para a determinação da motilidade dos tripomastigotas, 10 µL de suspensão de 1×10^7 parasitos foram avaliados em câmara de Neubauer e a porcentagem de parasitos móveis foi calculada pela avaliação no microscópio óptico.

4.4- Análises estatísticas

A parasitemia foi analisada pelo teste não-paramétrico Kolmogorov-Sminorv (KS), que compara a área sob a curva entre duas amostras. Os demais dados foram testados pela ANOVA – oneway e teste *t de student*. As análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.0. Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5.1- Parâmetros relacionados à utilização da DFA no curso da infecção e susceptibilidade do *T. cruzi* pelo teste rápido in vivo

5.1.1- Avaliação da parasitemia e mortalidade nos animais infectados, tratados (IDFA) e não tratados com DFA (I)

A parasitemia dos animais infectados (I) e infectados e tratados com DFA (IDFA) está representada na Figura 2A. Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros relacionados à curva de parasitemia dos animais dos grupos I e IDFA.

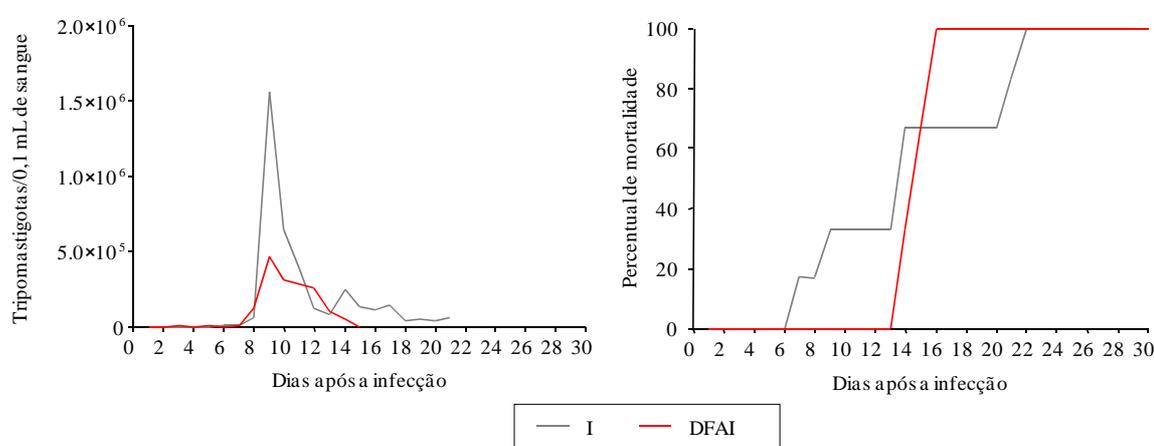


Figura 2- Curvas das médias de parasitemia (A) e percentual de mortalidade (B) de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *T. cruzi*. (I) animais infectados e não tratados, (IDFA) animais infectados e tratados com DFA.

Tabela 3- Parasitemia de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com DFA

Grupos	Período pré-patente (dias)	Período patente (dias)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia	Área sobre a curva
I	4	17	9	1.564.000	3.657.000
IDFA	6	7 [#]	9	465.000 [#]	1.597.000 [#]

[#] diferença significativa em relação ao grupo I.

Não foram observadas diferenças significativas entre o período pré-patente (PPP) nos animais dos grupos I (PPP=4) e DFAI (PPP=6). Por outro lado, o período patente (PP) no grupo IDFA (PP=7) foi significativamente menor quando comparado ao grupo I (PP=17 dias). O pico de parasitemia dos animais pertencentes ao grupo IDFA ocorreu no 9º dia. Os animais pertencentes ao grupo I apresentaram maior pico de parasitemia e área sobre a curva quando comparados ao grupo IDFA. A média dos níveis de parasitemia nos animais dos grupos IDFA (465.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue, respectivamente) foi 3 vezes menor que a observada no grupo I (1.564.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Os camundongos pertencentes ao grupo IDFA vieram a óbito a partir do 13º dpi e apresentaram taxa de mortalidade de 100% (Figura 2B).

5.1.2- Avaliação da parasitemia e mortalidade nos animais infectados, tratados com associação DFA e BZ (IDFA/BZ) e não tratados com DFA (I)

A parasitemia dos animais infectados e tratados com DFA+BZ (IDFA/BZ) está representada na Figura 3A. Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros relacionados à curva de parasitemia dos animais dos grupos I + IDFA/BZ.

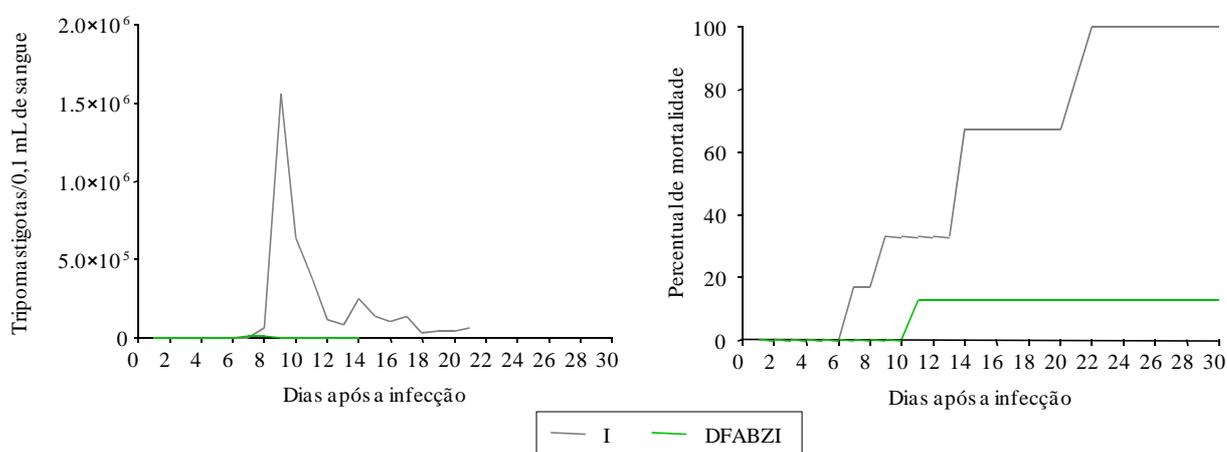


Figura 3- Curvas das médias de parasitemia (A) e percentual de mortalidade (B) de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. (I) animais infectados e não tratados, (IDFA/BZ) animais infectados e tratados com DFA e BZ.

Tabela 4- Parasitemia de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com DFA e BZ

Grupos	Período pré-patente (dias)	Período patente (dias)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia	Área sobre a curva
I	4	17	9	1.564.000	3.657.000
IDFA/BZ	5	9 [#]	8	11.875 [#]	43.963 [#]

[#] diferença significativa em relação ao grupo I.

Não foram observadas diferenças significativas entre o período pré-patente (PPP) nos animais dos grupos I (PPP=4) e IDFA/BZ (PPP=5). Por outro lado, o período patente (PP) no grupo IDFA/BZ (PP=9) foi significativamente menor quando comparado ao grupo I (PP= 17 dias). O pico de parasitemia dos animais pertencentes aos grupos IDFA/BZ ocorreu no 8^o dia. Os animais pertencentes ao grupo I apresentaram maior pico de parasitemia e área sobre a curva quando comparados ao grupo IDFA/BZ. A média dos níveis de parasitemia nos animais do grupo IDFA/BZ (11.875 tripomastigotas/0,1 mL de sangue, respectivamente) foi 132 vezes menor que a observada no grupo I (1.564.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Os camundongos pertencentes ao grupo IDFA/BZ vieram a óbito a partir do 10^o dpi e apresentaram taxa de mortalidade de 10% (Figura 3B).

5.1.3- Avaliação da parasitemia e mortalidade nos animais infectados, tratados (IBZ) e não tratados com BZ (I)

A parasitemia dos animais infectados (I) e infectados e tratados com BZ (IBZ) está representada na Figura 4A. Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros relacionados à curva de parasitemia dos animais dos grupos I e IBZ.

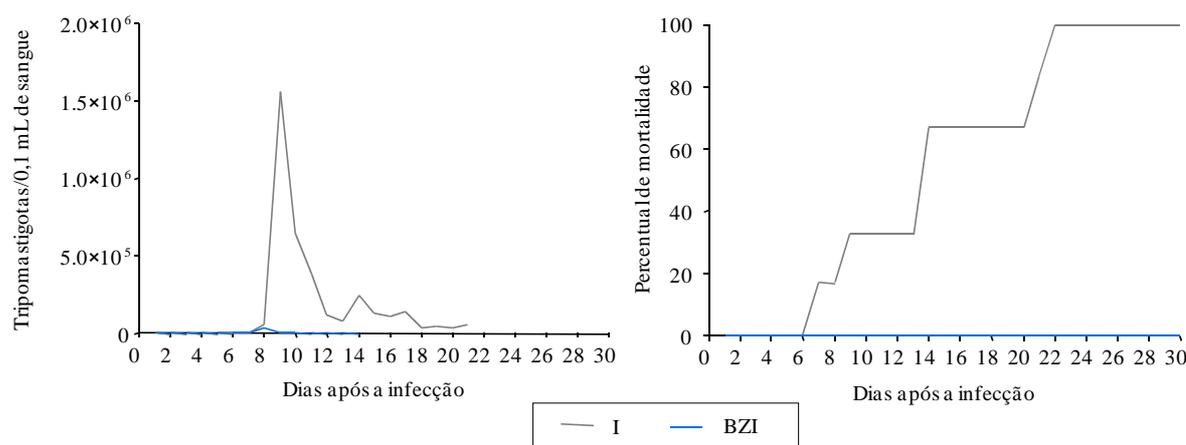


Figura 4- Curvas das médias de parasitemia (A) e percentual de mortalidade (B) de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *T. cruzi*. (I) animais infectados e não tratados, (IBZ) animais infectados e tratados com BZ.

Tabela 5- Parasitemia de camundongos suíços (n=24) inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com BZ

Grupos	Período pré-patente (dias)	Período patente (dias)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia	Área sobre a curva
I	4	17	9	1.564.000	3.657.000
IBZ	6	8 [#]	8	32.338 [#]	27.500 [#]

[#] diferença significativa em relação ao grupo I.

Não foram observadas diferenças significativas entre o período pré-patente (PPP) nos animais dos grupos I (PPP=4) e IBZ (PPP=6). Por outro lado, o período patente (PP) nos animais do grupo IBZ (PP=8) foi significativamente menor quando comparado ao grupo I (PP= 17 dias). O pico de parasitemia dos animais pertencentes aos grupos IBZ ocorreu no 8^o dia. Os animais pertencentes ao grupo I apresentaram maior pico de parasitemia e área sobre a curva quando comparados ao grupo IBZ. A média dos níveis de parasitemia nos animais do grupo IBZ (32.338 tripomastigotas/0,1 mL de sangue, respectivamente) foi 48 vezes menor que a observada no grupo I (1.564.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue).

Os camundongos pertencentes ao grupo IBZ apresentaram taxa de mortalidade de 0% (Figura 4B).

5.1.4- Análise da parasitemia pelo teste rápido *in vivo*

A parasitemia pelo teste rápido também foi utilizada para avaliar os efeitos da DFA em animais com alta infecção. Para esta finalidade, os camundongos foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA (25 mg/animal) e/ou BZ (500mg/kg) no dia do pico de parasitemia (7 DAI). A parasitemia foi avaliada antes do tratamento, 3 e 6 horas após o tratamento.

A parasitemia após 3 horas de tratamento foi reduzida significativamente nos grupos tratados com DFA (65.11%), BZ (65%) e DFA/BZ (89.9%). No entanto, 6 horas após o tratamento, apenas os grupos BZ e DFA/BZ persistiram com baixa parasitemia.

Os resultados estão apresentados na Figura 5.

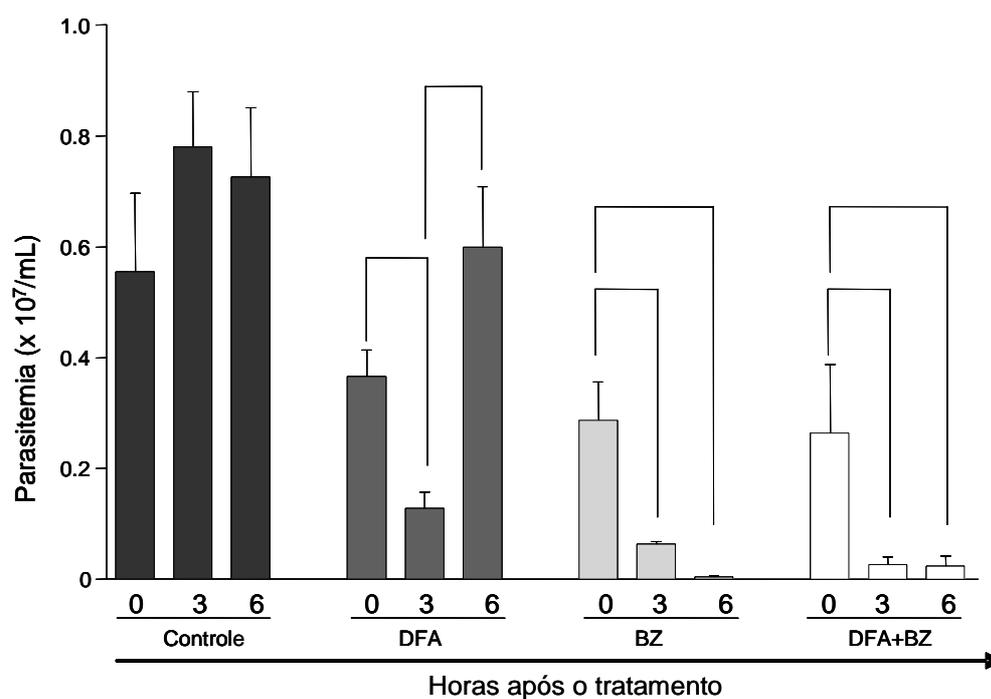


Figura 5- Camundongos suíços (n=20) foram inoculados com 50.000 formas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. Animais infectados e não tratados (I), animais infectados e tratados com Desferrioxamina (DFA 25mg/animal), animais infectados e tratados com Benzonidazol (BZ 500 mg/kg) e animais infectados e tratados com Benzonidazol e Desferrioxamina (BZ 500 mg/kg + DFA 25 mg/animal).

5.2- Parâmetros relacionados à utilização da DFA em biomarcadores do hospedeiro

5.2.1- Hemograma

Com o objetivo de investigar se a DFA interfere no número de células circulantes no sangue, foi realizado o eritrograma, a contagem diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas no sangue dos animais dos grupos C, CDFA, I e IDFA (n=60). Os resultados do eritrograma e contagem de plaquetas estão apresentados na Tabela 6 e os resultados do leucograma na Tabela 7.

Tabela 6- Eritrograma e plaquetas (média \pm desvio padrão)

<i>Grupos experimentais</i>	<i>DAI</i>	<i>Hemoglobina (g/dl)</i>	<i>Hematócrito (%)</i>	<i>Eritrócitos ($10^6/mm^3$)</i>	<i>Plaquetas ($10^3/mm^3$)</i>
<i>C</i>	0	14.2 \pm 0.1	47.6 \pm 9.5	8.9 \pm 1.8	356.7 \pm 405.0
	7	14.6 \pm 2.1	45.1 \pm 6.3	9.1 \pm 1.5	733.7 \pm 30.7
	14	11.4 \pm 4.0	28.8 \pm 12	3.0 \pm 1.2	495.0 \pm 278.6
	21	10.8 \pm 2.4	32.4 \pm 7.0	6.7 \pm 1.6	758.0 \pm 203.1
<i>CDFA</i>	0	13.5 \pm 2.2	44.4 \pm 6.9	8.1 \pm 1.3	743.0 \pm 241.8
	7	12.7 \pm 1.7	37.3 \pm 5.1	7.4 \pm 0.9	724.0 \pm 150.2
	14	6.0 \pm 0.8	24.8 \pm 2.0	3.4 \pm 0.4	303.7 \pm 32.6
	21	11.8 \pm 1.8	34.5 \pm 4.4	6.6 \pm 0.8	319.7 \pm 193.5
<i>I</i>	0	10.4 \pm 1.2	31.3 \pm 7.8	6.2 \pm 1.6	596.7 \pm 405.6
	7	10.0 \pm 2.5	29.5 \pm 8.4	5.6 \pm 1.4	711.7 \pm 46.8
	14	9.1 \pm 0.8	27.4 \pm 2.2	6.1 \pm 0.6	489.7 \pm 420.9
	21	8.7 \pm 7.5	26.6 \pm 2.1	5.6 \pm 4.4	357.3 \pm 245.1
<i>IDFA</i>	0	9.5 \pm 1.4	26.9 \pm 2.6	5.1 \pm 0.3	601.3 \pm 413.5
	7	10.9 \pm 2.2	34.0 \pm 8.3	5.2 \pm 1.3	581.7 \pm 130.6
	14	8.6 \pm 4.9	31.9 \pm 12.2	5.1 \pm 3.4	319.0 \pm 254.2
	21	10.6 \pm 0.8	30.9 \pm 2.2	6.3 \pm 0.6	483.3 \pm 180.2

Tabela 7- Leucograma (média \pm desvio padrão)

<i>Grupos experimentais</i>	<i>DAI</i>	<i>Leucócitos (per mm³)</i>	<i>Neutrófilos (%)</i>	<i>Linfócitos (%)</i>	<i>Monócitos (%)</i>	<i>Eosinófilos (%)</i>
<i>C</i>	0	8.6 \pm 1.5	13.0 \pm 5.6	72.0 \pm 8.0	13.7 \pm 1.5	2.0 \pm 0.0
	7	12.6 \pm 2.1	10.7 \pm 8.1	80.7 \pm 11.9	7.7 \pm 3.8	1.5 \pm 0.7
	14	6.2 \pm 2.7	19.3 \pm 6.1	72.3 \pm 7.2	6.0 \pm 4.4	4.0 \pm 2.8
	21	9.9 \pm 3.2	15.0 \pm 4.6	74.3 \pm 10.7	7.3 \pm 8.4	3.3 \pm 2.3
<i>CDFA</i>	0	8.7 \pm 0.5	11.7 \pm 3.8	68.7 \pm 13.8	19.0 \pm 9.6	1.0 \pm 0.0
	7	9.8 \pm 3.9	13.5 \pm 4.9	81.0 \pm 4.4	8.3 \pm 2.5	1.7 \pm 1.2
	14	3.5 \pm 0.4	9.7 \pm 4.5	82.3 \pm 5.1	7.0 \pm 1.7	1.5 \pm 0.7
	21	9.0 \pm 4.1	10.0 \pm 6.6	76.0 \pm 3.0	10.3 \pm 2.3	11.0 \pm 0.0
<i>I</i>	0	7.7 \pm 3.9	3.3 \pm 1.5	94.3 \pm 0.6	2.3 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0
	7	7.9 \pm 1.2	14.7 \pm 6.1	81.0 \pm 4.0	4.3 \pm 3.2	0.0 \pm 0.0
	14	10.3 \pm 6.8	7.0 \pm 7.8	90.7 \pm 6.7	1.5 \pm 0.7	1.3 \pm 0.6
	21	10.4 \pm 1.6	2.3 \pm 0.6	97.3 \pm 0.6	1.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
<i>IDFA</i>	0	6.5 \pm 2.8	7.7 \pm 3.8	89.7 \pm 7.1	3.5 \pm 0.7	1.0 \pm 0.0
	7	9.1 \pm 2.7	6.7 \pm 1.5	90.7 \pm 2.5	2.7 \pm 2.1	0.0 \pm 0.0
	14	9.7 \pm 6.2	3.7 \pm 2.9	93.7 \pm 2.3	2.7 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0
	21	10.4 \pm 1.3	11.0 \pm 9.2	87.3 \pm 9.6	1.7 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0

Não foram observadas diferenças significativas no eritrograma (hemoglobina, hematócrito, eritrócitos), plaquetas e contagem de leucócitos entre os grupos C x CDFA e I X IDFA, indicando que o esquema terapêutico utilizado não foi acompanhado por um evidente comprometimento da diferenciação eritroide, mieloide e megacariocítica.

5.2.2 - Avaliação dos níveis séricos de ferro

Sendo a DFA um importante quelante de ferro, as dosagens realizadas a seguir têm como propósito investigar o seu efeito no metabolismo de ferro no hospedeiro. Para cumprir com este objetivo, foram avaliados os níveis de ferritina, ferro sérico e CTLF. A figura 6 representa a dosagem de ferro nos animais dos grupos C, CDFA, I e IDFA.

Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros (ferritina, ferro sérico e capacidade total de ligação de ferro) nos grupos analisados, sugerindo que o efeito da DFA sobre o curso da doença não foi dependente do metabolismo de ferro do hospedeiro.

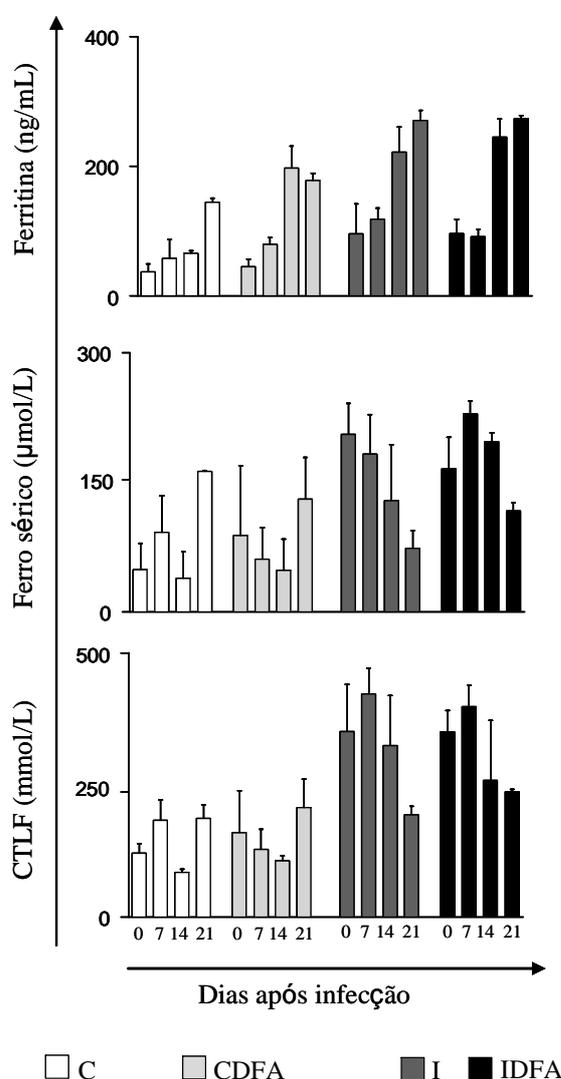


Figura 6- Camundongos suíços (n=60) foram infectados ou não com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA. Níveis de ferritina, ferro sérico e capacidade total de ligação de ferro (CTLF) foram avaliados no dia do inóculo (tempo=0) ao 7^o, 14^o e 21^o DAI. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.

5.2.3- Análise do perfil fenotípico linfocitário do baço

Com o objetivo de caracterizar o efeito do tratamento com a DFA durante a infecção sobre a resposta imune inata e adquirida ao longo da fase aguda, foi realizada análise fenotípica de células esplênicas para avaliar as populações de células NK⁺, linfócitos B, células CD4⁺ e CD8⁺.

5.2.3.1- Perfil fenotípico linfocitário no baço dos animais dos grupos I e IDFA

A Figura 7 apresenta a distribuição das populações linfocitárias em células esplênicas, sendo apresentadas como células NK (CD49⁺), linfócitos B (CD19⁺), linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, dos animais tratados ou não com DFA, na presença ou ausência de infecção (grupos C, I, CDFA, e IDFA).

A análise desses dados não demonstrou qualquer efeito da DFA sobre a distribuição das populações linfocitárias, seja nos animais infectados ou nos não infectados, nos diferentes tempos avaliados: dia do inóculo (tempo 0) ao 7^o, 14^o e 21^o DAI.

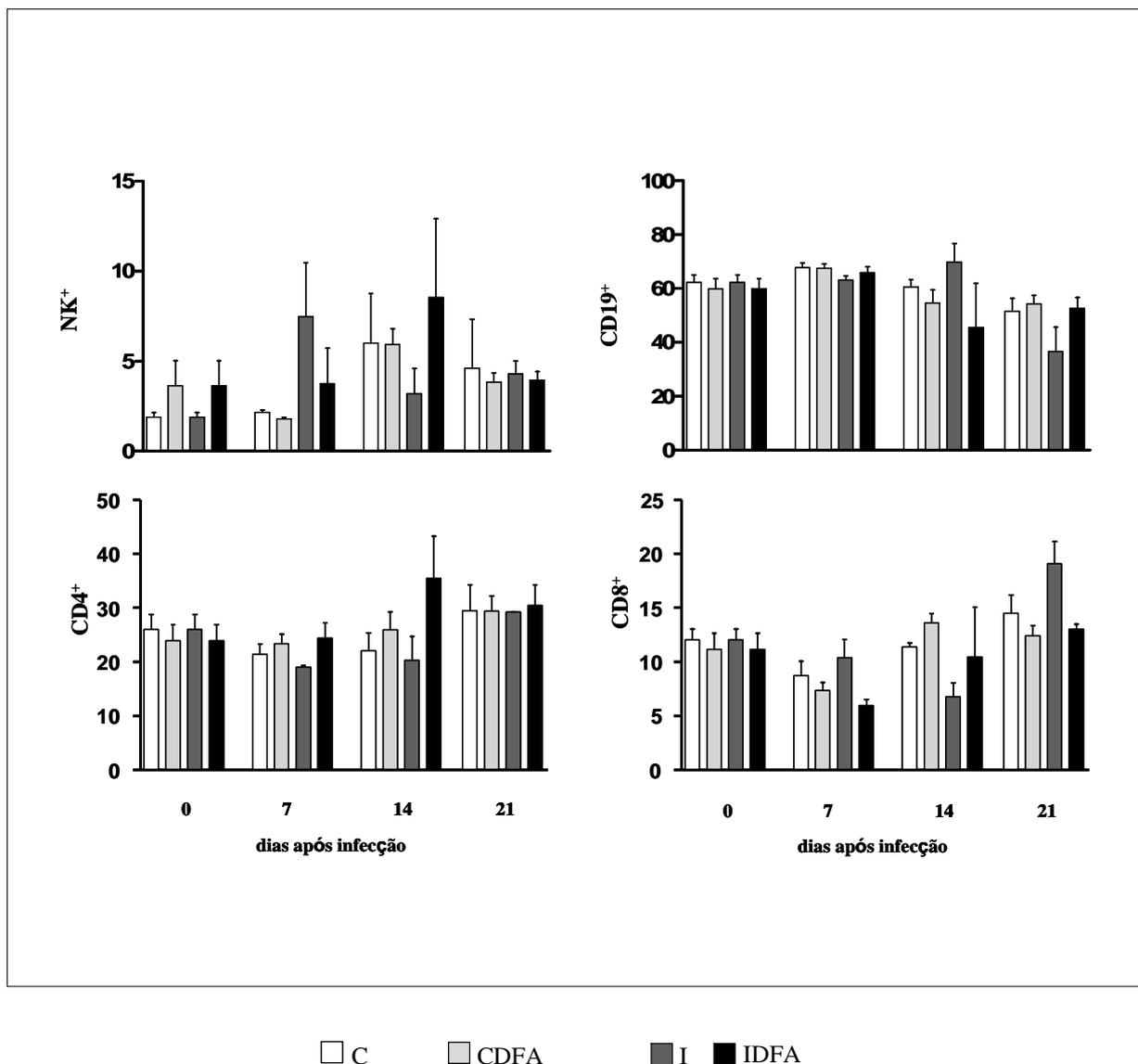


Figura 7- Percentual médio das células NK (CD49b⁺), linfócitos B (CD19⁺) e células CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção no dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.

5.2.3.2- Padrão de citocinas produzidas pelas células mononucleares esplênicas de animais infectados, tratados ou não com DFA

Com o objetivo de caracterizar o efeito do tratamento com a DFA durante a infecção sobre o padrão de citocinas produzidas por células da imunidade inata (células NK⁺) e adaptativa (CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺) presentes no baço, foi caracterizada a frequência de células produtoras de IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ e IL-10⁺, em cada população (Figuras 8, 9 e 10).

Observou-se aumento percentual de células NK produtoras de TNF- α nos animais tratados com DFA, infectados e não infectados, no 7^o DAI. Este aumento foi acompanhado pelo aumento de células NK IL-10⁺, observado nos animais infectados.

Na vigência da infecção, a DFA também induziu aumento percentual de células CD4⁺ produtoras de IL-10 no 14^o DAI.

Considerando o contexto de ausência de infecção, observou-se aumento percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , após 28 dias de tratamento com DFA. Este efeito também foi observado nas células CD8⁺ produtoras de TNF- α .

Em relação aos linfócitos B, a DFA induziu queda no percentual de células produtoras de IFN- γ após 28 dias de tratamento, e aumento percentual de células produtoras de TNF- α após 14 e 35 dias de tratamento.

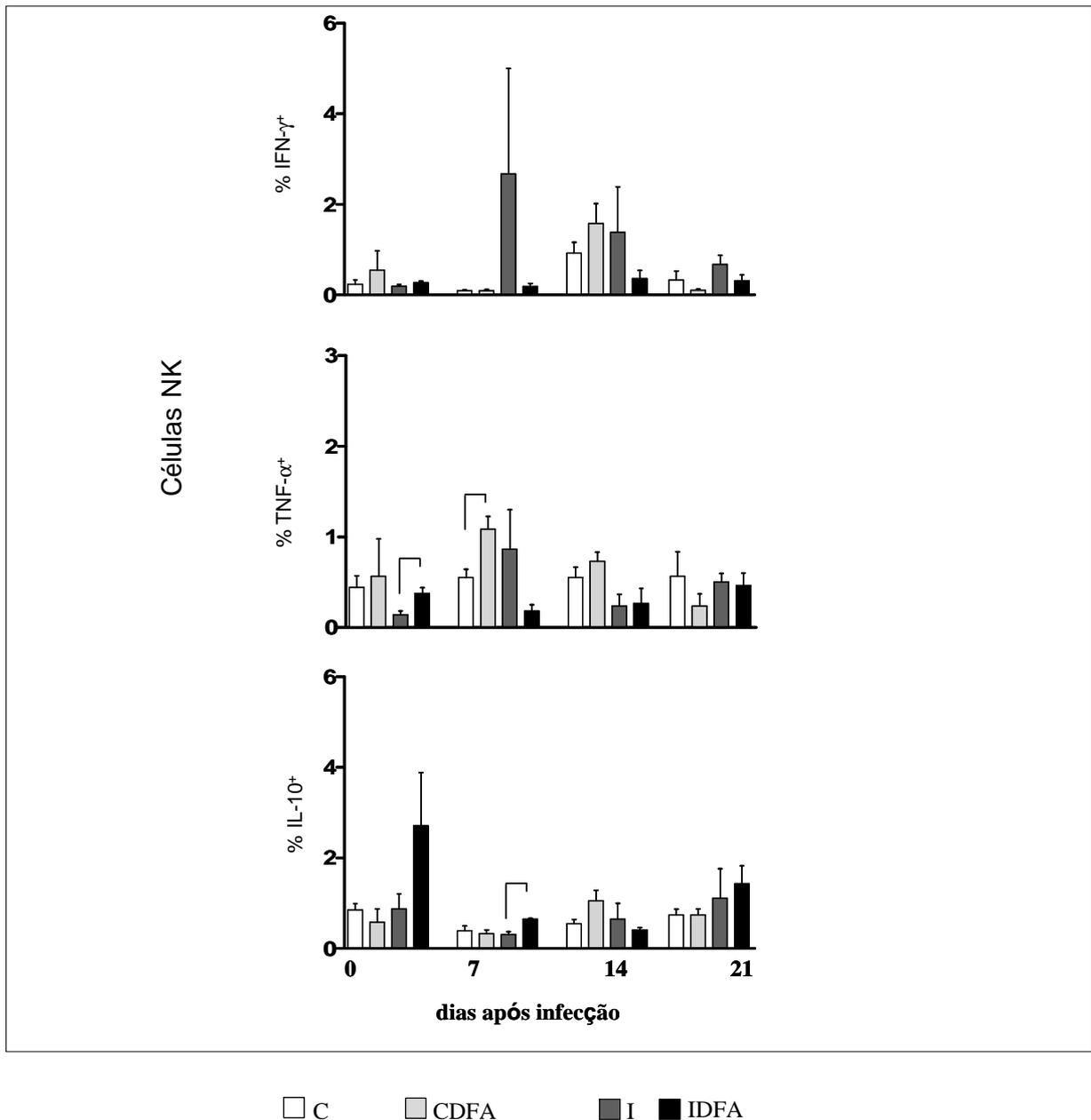


Figura 8- Percentual de células NK⁺ IFN- γ^+ TNF- α^+ ou IL-10⁺ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção em relação ao dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As barras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nos períodos avaliados.

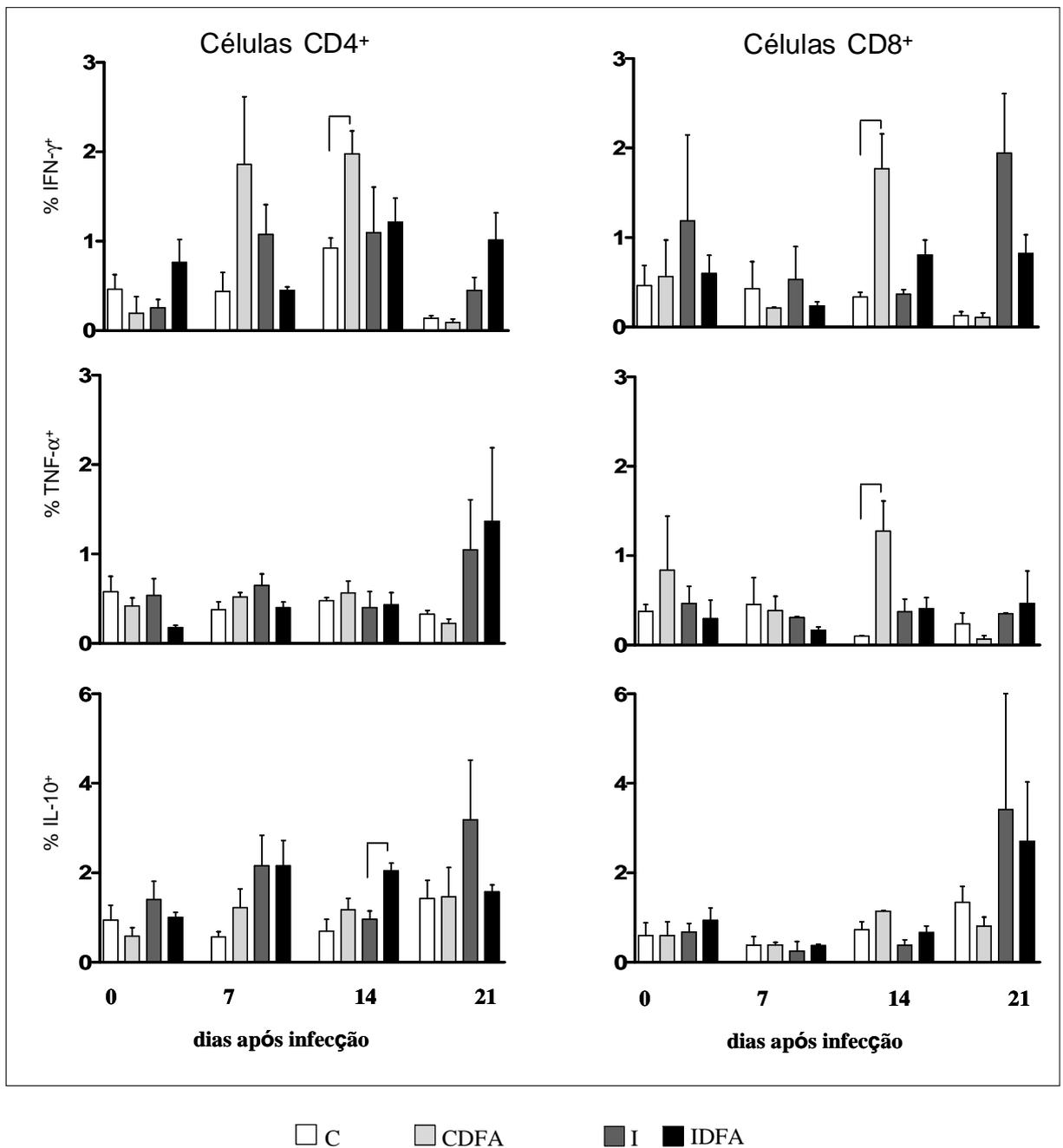


Figura 9- Percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção em relação ao dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As barras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nos períodos avaliados.

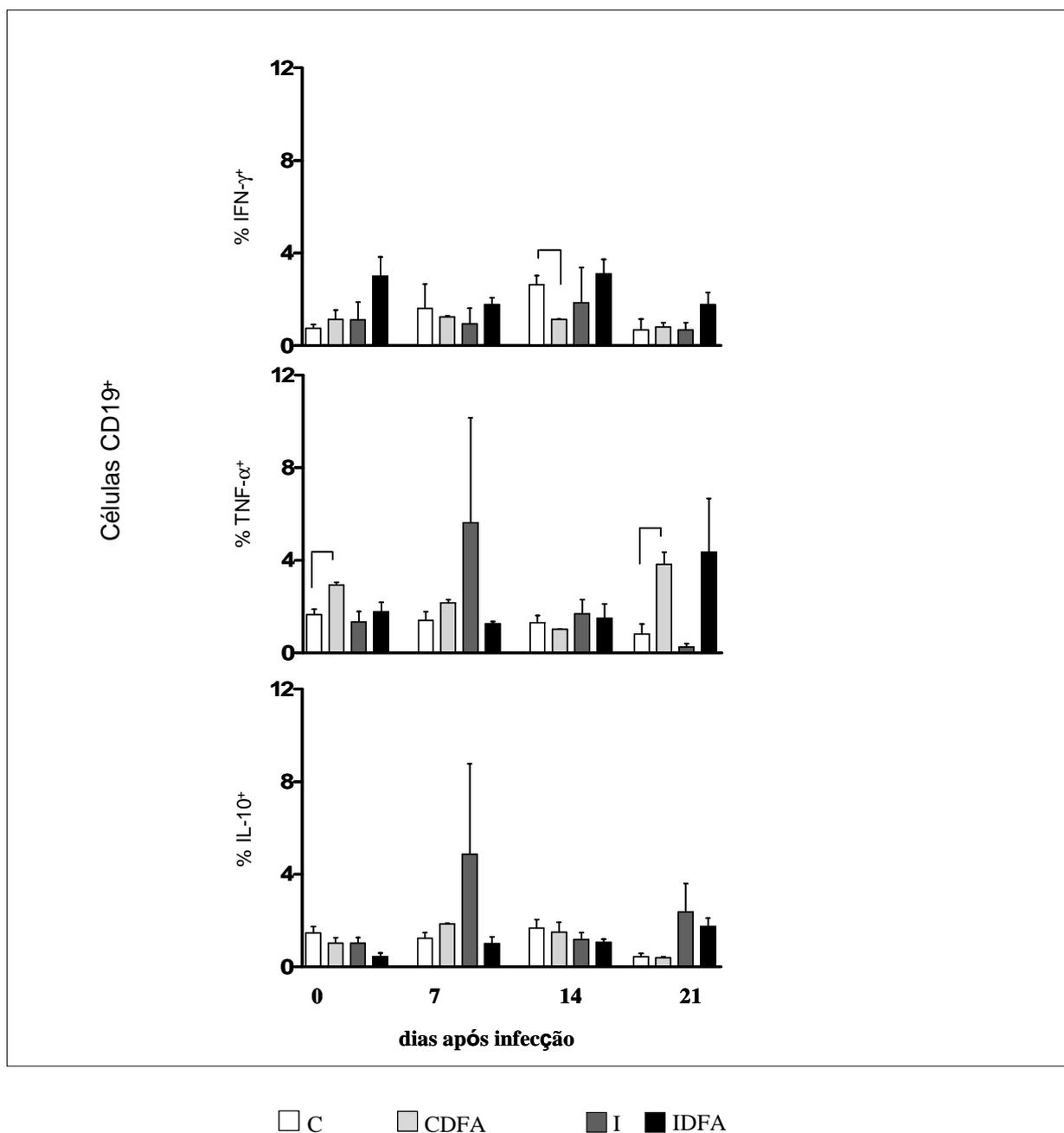


Figura 10- Percentual de células CD19⁺ IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos suíços que foram infectados ou não (I e C) com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e receberam tratamento ou não com DFA (IDFA e I) avaliados ao longo da fase aguda da infecção em relação dia do inóculo (tempo=0) e aos 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As barras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos nos períodos avaliados.

5.3- Atividade do fármaco DFA sobre o *T. cruzi*

5.3.1- Avaliação da inibição do crescimento do *T. cruzi* em cultura de fibroblasto

A partir de cultura de fibroblasto foi avaliado o crescimento da cepa Tulahuen do *T. cruzi* na presença da DFA. A atividade da DFA representada pela inibição do crescimento das formas amastigotas e tripomastigotas do parasito em cultura está apresentada na Figura 11.

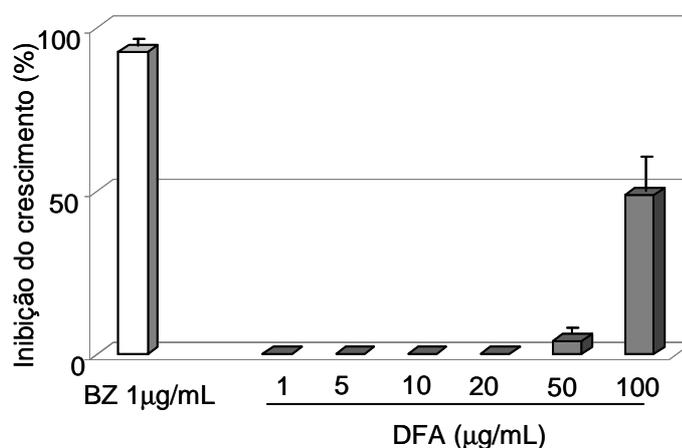


Figura 11- *T. cruzi* (cepa Tulahuen) expressando a enzima beta- galactosidase da *Escherichia coli* cultivado por 4 dias em cultura de fibroblastos L929 na presença de diferentes concentrações de Desferrioxamina (DFA). A atividade tripanocida foi calculada pela atividade da enzima b-galactosidase. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição do crescimento. O Benzimidazol (BZ) foi utilizado como controle positivo.

Utilizando o BZ como controle positivo, a DFA apresentou-se ativa na concentração de 100 µg/mL (IC₅₀). Nesta concentração utilizada da DFA, a porcentagem de inibição do crescimento das formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foi de 49%, enquanto que a inibição do crescimento com o BZ na concentração de 1 µg/mL foi de 93%.

5.3.2- Ensaio de viabilidade (marcação pelo trypan blue) do *T. cruzi* com a DFA

A viabilidade do parasito foi analisada pela marcação pelo corante trypan blue. As células L929 foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de DFA (1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL) ou BZ (1 e 5 µg/mL) em tempos diferentes de incubação (0, 0.5, 1, 3, 6, 9 e 12 horas). Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Avaliação cinética da viabilidade (% de parasitos viáveis não marcados por trypan blue) das formas tripomastigotas cultivadas na presença de DFA e/ou BZ (média± desvio padrão).

Grupos experimentais (µg/mL)	0.5 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h
Violeta de Genciana	4.5 ± 1	9.6 ± 8	6.4 ± 2	6.4 ± 4	3.3 ± 0	3.0 ± 0
BZ 1	86.8 ± 7	80.9 ± 6	75.3 ± 9	81.4 ± 3	81.9 ± 4	74.3 ± 1
BZ 5	85.2 ± 0	84.6 ± 2	81.2 ± 6	79.6 ± 3	75.2 ± 6	75.6 ± 4
DFA 1	84.8 ± 7	82.6 ± 3	86.1 ± 6	78.2 ± 1	80.8 ± 0	80.4 ± 5
DFA 5	77.6 ± 8	88.0 ± 4	79.9 ± 6	87.4 ± 3	77.2 ± 2	87.8 ± 5
DFA 10	90.7 ± 1	86.5 ± 5	74.1 ± 1	79.3 ± 1	72.8 ± 9	75.9 ± 7
DFA 20	86.9 ± 7	89.9 ± 2	82.9 ± 2	83.1 ± 3	79.3 ± 2	78.3 ± 4
DFA 50	84.1 ± 6	82.3 ± 3	82.9 ± 4	82.3 ± 4	74.6 ± 3	78.7 ± 5
DFA 100	82.6 ± 5	79.4 ± 7	76.2 ± 4	70.8 ± 3	69.8 ± 8	78.9 ± 2
DFA 1 + BZ 1	87.0 ± 6	79.6 ± 8	74.2 ± 2	78.7 ± 5	72.2 ± 1	75.1 ± 1
DFA 5 + BZ 1	88.5 ± 5	82.1 ± 2	83.8 ± 8	70.8 ± 9	76.1 ± 1	76.6 ± 9
DFA 10 + BZ 1	81.9 ± 3	79.9 ± 4	77.1 ± 5	74.3 ± 3	71.6 ± 1	82.6 ± 1

Os parasitos permaneceram viáveis nas porcentagens de 70 a 90% em todas as concentrações utilizadas da DFA (1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL) e BZ (1 e 5 µg/mL) em diferentes tempos de incubação (0, 0.5, 1, 3, 6, 9 e 12 horas) sem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

5.3.3- Ensaio de marcação com anexina e PI (apoptose)

Um suposto processo de apoptose induzido pela DFA foi avaliado pela externalização de fosfatidilserina. Da mesma forma que os resultados de viabilidade por trypan blue, a maioria dos parasitos tratados com DFA não apresentaram nenhuma marcação com PI ou anexina V-FITC em até 3 horas de incubação, sugerindo a preservação dos mesmos. Como o iodado de propídio é um marcador nuclear de permeabilidade de membrana, estes resultados mostram integridade de membrana.

Os resultados estão apresentados na figura 12.

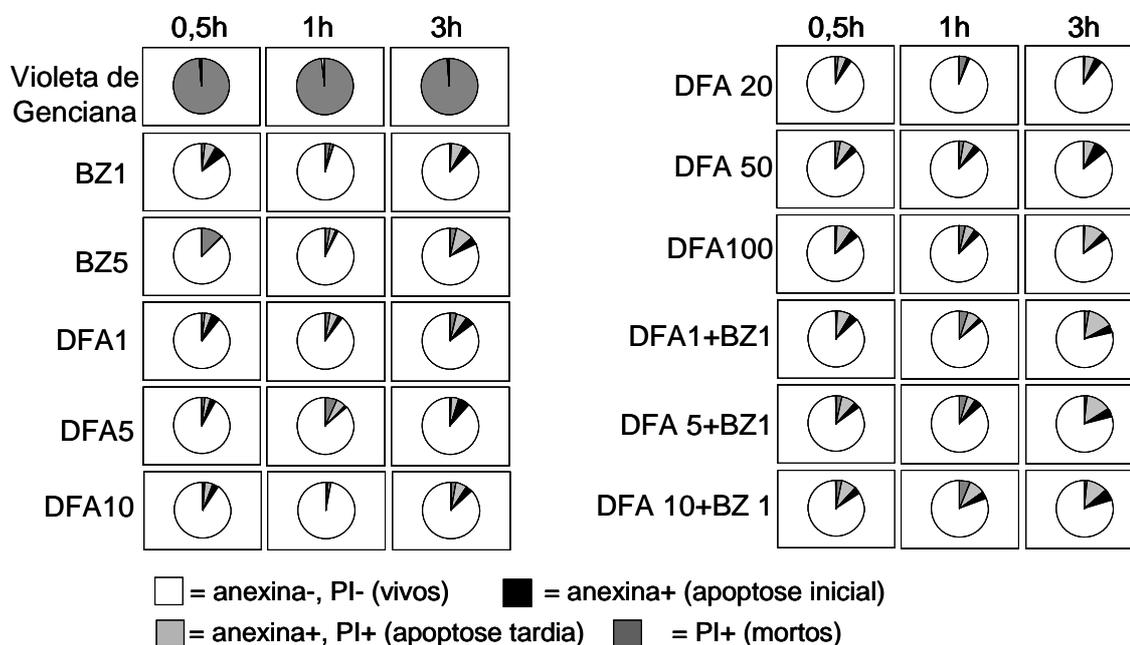


Figura 12- Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* cultivadas em células L929, na presença ou não de Desferrioxamina (DFA). O Benzimidazol (BZ) e a violeta de genciana foram utilizados como controles. Suspensão de 1×10^6 parasitos foram marcadas duplamente com anexina V conjugado com FITC e PI. Os parasitos que não apresentaram marcação com anexina ou PI foram considerados vivos (branco). Os parasitos marcados somente com anexina foram considerados em processo inicial de apoptose (preto). Os parasitos marcados duplamente com PI e anexina foram considerados em processo tardio de apoptose (cinza claro). Os parasitos marcados somente com PI foram considerados mortos (cinza escuro).

5.3.4- Ensaio de motilidade do *T. cruzi* com a DFA

Para testar o efeito da DFA na motilidade do parasito, foi realizada uma contagem do número de parasitos móveis no sobrenadante de células L929 utilizando diferentes concentrações de DFA (1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em diferentes tempos de incubação (1, 3, 6, 9 e 12 horas). Os resultados estão sendo apresentados na Figura 13.

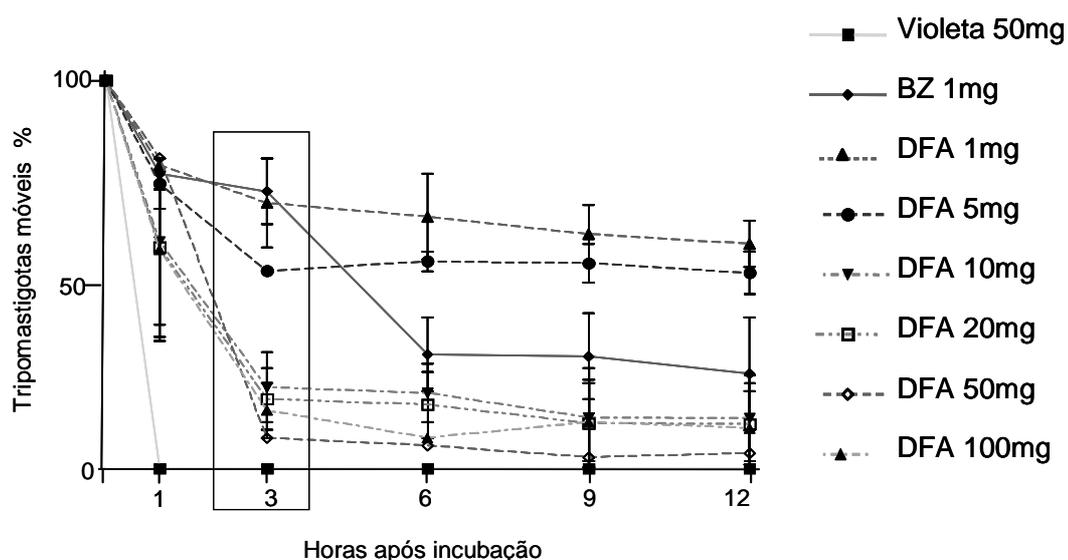


Figura 13- As formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas em células L929 na presença de diferentes concentrações de Desferrioxamina (DFA) e sua motilidade foi avaliada após 1, 3, 6, 9 e 12 horas. O Benzonidazol (BZ) e violeta de genciana foram utilizados como controle.

Foi observado um efeito tripanostático da DFA em concentrações subletais do fármaco. Após 3 horas de incubação, a DFA utilizada em concentrações maiores que 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram-se mais eficientes na redução da motilidade do parasito em comparação ao BZ na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$). Observou-se também que a DFA em concentrações maiores que 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou-se mais eficiente do que na menor concentração da DFA utilizada-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$).

Atualmente não há tratamento eficaz para DC, infecção comumente encontrada na lista das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. Somente dois fármacos são usados clinicamente, o BZ e o Nifurtimox, ambos desenvolvidos há mais de quatro décadas (COURA & DE CASTRO, 2002). Estes compostos estão longe de apresentarem características que determinam um fármaco ideal, devido a vários efeitos colaterais e eficácia limitada, especialmente em pacientes com a forma crônica da doença (ROCHA *et al.*, 2007, SOEIRO *et al.*, 2009). Os efeitos colaterais variam de um desconforto discreto a polineuropatia periférica, dermatite por hipersensibilidade e distúrbios hematológicos que levam à interrupção do tratamento. No Brasil, apenas o BZ encontra-se disponível para uso clínico.

Apesar da falta de interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver novos compostos para a DC, novos fármacos como o alopurinol, itraconazol e fluconazol têm sido testados em ensaios clínicos. Eles são a última geração de anti-fúngicos, que agem impedindo a síntese de esteróis (COURA, 2009). No entanto, mais opções terapêuticas são necessárias, não apenas para serem utilizados na monoterapia, mas também na terapia combinada, que poderia apresentar uma eficácia maior e reduzir a toxicidade.

A utilização de quelantes tem sido proposta como uma estratégia para interferir com a progressão de muitas doenças como a aterosclerose, o câncer (YU *et al.*, 2006) e doenças neurológicas (RICHARDSON, 2004) e infecciosas (SPELLBERG *et al.*, 2005).

O Desferal, marca comercializada da DFA, 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). A DFA possui período curto de meia-vida no plasma, devido ao seu rápido metabolismo (AOUAD *et al.*, 2002). Deve ser administrada lentamente, em contínuas infusões parenterais com doses diárias de 100 a 150 mg/kg em humanos (SUMMERS *et al.*, 1979, LEE *et al.*, 1993).

A DFA também é conhecida por modular a inflamação e por ser um antioxidante eficaz em condições normais e de estresse oxidativo, funcionando através da atividade neutralizadora de radicais livres e quebra da cadeia lipídica (MINOTTI *et al.*, 1987, RACHIDI *et al.*, 1994). Francisco *et al.* (2010), avaliando o stress oxidativo em camundongos infectados com o *T. cruzi* e tratados com a DFA, demonstraram que a DFA aumenta a atividade antioxidante mas também aumenta o stress oxidativo, indicando que o

modo de ação do fármaco envolve uma contribuição positiva para o hospedeiro com um efeito que não é benéfico para o parasito.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a DFA é eficaz no tratamento da infecção experimental por protozoários. A DFA induz a inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum* (HERSHKO & PETO, 1988) e em formas sanguíneas do *Trypanosoma brucei* (BREIDBACH *et al.*, 2002). Ela também foi considerada um fármaco promissor contra o *Toxoplasma gondii* em camundongos (MAHMOUD, 1999). Estudos de malária em humanos demonstraram que o tratamento com DFA, isolada ou em combinação com a terapia padrão, aumentou a remoção do parasito na malária assintomática e grave (TRAORE *et al.*, 1991, GORDEUK *et al.*, 1992, MABEZA *et al.*, 1996).

Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, Arantes *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento com DFA em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, 14 dias antes da infecção e por mais 21 dias após a infecção, levou à menor parasitemia e menores taxas de mortalidade quando comparado a animais infectados não tratados, apesar das dosagens de ferro sérico e de hemoglobina não terem sofrido diminuição em seus níveis. Mais recentemente, foi demonstrado que a associação de DFA e BZ, exibe alta eficácia e uma taxa de mortalidade de 0% em camundongos (FRANCISCO *et al.*, 2008).

Apesar da clara evidência de que a DFA, em tratamento sustentado, é capaz de reduzir a intensidade da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos, os mecanismos empregados em seu efeito benéfico ainda não estão claros e podem envolver diferentes mecanismos independentes de depleção de ferro do hospedeiro. Com o objetivo de caracterizar o impacto da utilização da DFA no curso da infecção em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, foram avaliadas a parasitemia e a mortalidade destes animais.

No presente trabalho, os resultados de parasitemia e mortalidade entre os grupos I x IDFA reproduziram dados de trabalhos anteriores demonstrando que a intensidade da infecção pela cepa Y em camundongos foi atenuada pelo tratamento com a DFA (ARANTES *et al.*, 2007, FRANCISCO *et al.*, 2008). Esse efeito parece estar relacionado à linhagem e ou à dose utilizada, uma vez que Pedrosa *et al.* (1990) mostraram que o tratamento em dose única de DFA (no 5 dpi) não conduziu a uma infecção menos grave em camundongos suíços infectados com as cepas Y e CL do *T. cruzi*. 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, sensível ao tratamento com DFA. Entretanto, é provável que diferenças no desenho dos experimentos tenham contribuído para as diferenças

encontradas. O inóculo utilizado por aqueles autores (1400 formas tripomastigotas) foi maior que o utilizado em nossos experimentos (500 formas tripomastigotas) e o esquema de tratamento consistiu em dose única de DFA no 5^o DAI. A utilização de pequenas doses contínuas da DFA, antes e durante a infecção, parece ser condição necessária para proteção dos camundongos infectados.

No trabalho realizado por Postma *et al.* (1998), procurou-se otimizar a DFA no tratamento do *Plasmodium vinckei* em camundongos. A DFA foi administrada através de injeções subcutâneas múltiplas ou infusão intraperitoneal da droga livre e múltiplas injeções subcutâneas da DFA na forma lipossomal. As múltiplas injeções subcutâneas da droga antes e durante a infecção controlaram a parasitemia, enquanto as injeções somente anteriores à infecção não conseguiram controlar a parasitemia. A supressão da parasitemia e a sobrevivência dos camundongos a longo prazo (mais de 1 mês após infecção) foram obtidas pela infusão intraperitoneal iniciada um dia antes da infecção ou por injeções subcutâneas da DFA na forma lipossomal anterior à infecção. Os resultados deste trabalho também indicaram que a exposição contínua do parasito a doses baixas da DFA (130 mg/Kg/dia) é suficiente para remover a parasitemia.

A parasitemia pelo teste rápido também foi utilizada para avaliar os efeitos da DFA em animais com alta infecção a curto prazo. Esta metodologia detecta a ação contra formas do parasito circulantes no sangue, utilizando o fármaco em concentração cinco vezes maior que a recomendada. Brener foi o primeiro pesquisador a investigar a susceptibilidade das formas sanguíneas do *T. cruzi* a compostos ativos utilizando essa metodologia e mostrou que as formas delgadas persistem por algumas horas na corrente sanguínea antes de penetrar nos tecidos do hospedeiro (BRENER, 1969, 1971, FILARDI & BRENER, 1984). Assim, por este teste, considera-se que fármacos ativos são capazes induzir uma rápida diminuição do número de parasitos circulantes e, por isso, é empregado na seleção de compostos ativos contra o *T. cruzi*. Esta abordagem complementa ensaios em diferentes estágios intracelulares do *T. cruzi* (MARIA *et al.*, 1972) e tem sido utilizada recentemente por outros autores (ALVES *et al.*, 1999, AGUIRRE-IVARADO *et al.*, 2007).

Nossos resultados obtidos com este método corroboram aqueles obtidos no tratamento prolongado. Ambos apresentaram menor intensidade de infecção na presença de tratamento com DFA. Entretanto, tratou-se de um efeito não-sustentado, uma vez que a DFA foi capaz de reduzir a parasitemia apenas em período precoce, três horas após tratamento. Após seis horas, os níveis de parasitos foram semelhantes aos encontrados em animais não tratados.

Este fato provavelmente se deve à meia-vida curta no plasma e ao rápido metabolismo da DFA (AOUAD *et al.*, 2002). Trabalho anterior de Bunnag e colaboradores mostrou que a DFA reduziu a parasitemia de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* em humanos, mas a ação foi precoce e seguida por reativação, provavelmente também devido à meia vida curta do fármaco (BUNNAG *et al.*, 1992).

Sendo a DFA um importante quelante de ferro, o propósito aqui também foi investigar se o fármaco, na dose empregada, interfere no metabolismo de ferro do hospedeiro e no número de células sanguíneas circulantes no sangue. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros (ferritina, ferro sérico e capacidade total de ligação de ferro) e no número de células circulantes.

Esses dados sugerem que o efeito da DFA sobre o curso da doença independe do estabelecimento de ferropenia e demonstram que o esquema terapêutico utilizado não foi acompanhado por um evidente comprometimento da diferenciação eritroide, mieloide, linfoide e megacariocítica.

No trabalho realizado por Pedrosa *et al.* (1990), também não foi verificada a redução dos níveis de ferro sérico bem como a anemia induzida pela DFA em camundongos infectados pelas cepas Y, CL e YuYu, e tratados com dose única de DFA. Também Lalonde & Holbein (1984), utilizando doses isoladas no 5^o e 6^o dias de infecção, demonstraram que não ocorreram mudanças significativas nos níveis de ferro no soro de camundongos tratados com DFA.

Em nossos estudos anteriores, utilizando o protocolo atual com doses baixas diárias (tratamento prolongado), também não foi observada diminuição nos níveis de ferro sérico e hemoglobina de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com DFA (ARANTES *et al.*, 2007). Francisco *et al.* (2008) mostraram que as concentrações de ferro sérico foram maiores nos animais tratados com DFA ou com a associação DFA/BZ quando comparados aos animais infectados que não receberam a DFA.

Considerando todos esses trabalhos, é provável que a sensibilidade do *T. cruzi* à DFA seja maior que a das células do hospedeiro.

Com base nesses fatos, buscamos verificar se a DFA exerce algum efeito direto sobre o parasito. Para esta finalidade, foram avaliadas a inibição do crescimento do parasito, viabilidade pelo trypan blue, apoptose e motilidade.

Para avaliar a ação tripanocida da DFA *in vitro*, utilizou-se o protocolo estabelecido por Buckner *et al.* (1996) com modificações. Este protocolo foi, recentemente, recomendado

pelo Workshop em Modelos Experimentais em Triagem de Drogas e Desenvolvimento para a DC (2008), realizado pelo Programa da Fiocruz para a Investigação e Desenvolvimento Tecnológico em DC e Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas, publicado por Romanha *et al.* (2010).

Nossos dados mostraram inibição discreta do crescimento de formas tripomastigotas e ou amastigotas induzida pela DFA. A inibição induzida pelo BZ foi cerca de 200 vezes mais eficaz que a DFA. Mas interessante, a viabilidade parasitária, avaliada pela marcação pelo corante trypan blue, não foi alterada pela ação da DFA ou BZ.

A capacidade de redução do crescimento do parasito pela DFA já foi previamente relatada por Loo & Lalonde (1984). Os autores demonstraram que a DFA reduziu a taxa de replicação das formas amastigotas em culturas de células tratadas de forma dose dependente, depletando o ferro da célula hospedeira.

O envolvimento da apoptose como possível mecanismo de ação da DFA em *T. cruzi* foi testada neste trabalho. Em nossos dados, observou-se que a DFA não induziu apoptose significativa em tripomastigotas, indicando que este não é o principal mecanismo de ação da DFA e novos estudos devem ser realizados para melhor elucidar este possível mecanismo. Alguns trabalhos demonstraram que a apoptose pode ser induzida em parasitos unicelulares, incluindo o *T. cruzi* (AMEISEN *et al.*, 1995, PIACENZA *et al.*, 2001). As formas infectantes do *T. cruzi* e *Leishmania spp.* apresentam fosfaditilserina, um marcador de células apoptóticas (DE FREITAS BALANCO 2001, DAMATTA *et al.*, 2007). Foi também demonstrado que a apoptose de leishmanias é requerida para o sucesso no estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2006).

Apesar da DFA apresentar apenas efeitos discretos sobre o crescimento do parasito e apoptose e nenhuma alteração na viabilidade do parasita, a motilidade do parasito foi significativamente diminuída com a sua utilização do fármaco. Este resultado é de grande importância, pois sugere um efeito tripanostático. Pouco se sabe sobre a atividade da DFA sobre o *T. cruzi*, e este efeito tripanostático pode ser importante na ação da DFA no controle de parasitos.

Efeitos sobre a motilidade em parasitos já foram anteriormente observados com a utilização de determinados fármacos. Kamau *et al.* (2001) descreveram efeito leishmanioestático do alopurinol, observado pela análise da divisão celular em citômetro de fluxo, através da marcação por CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*). No entanto, o mecanismo subjacente a esta ação não é totalmente compreendido.

Assim, considerando os resultados, sugerimos um suposto efeito tripanostático da DFA que está aparentemente livre de efeitos tóxicos importantes. É provável, que através de ação direta sobre o parasito, a DFA apresente propriedade tripanostática mais eficaz do que tripanocida.

Aprofundando mais nosso estudo, investigamos também a repercussão do tratamento com o DFA sobre a resposta imune inata e adquirida ao longo da fase aguda.

Sabe-se que a DFA apresenta diferentes ações sobre a resposta imune. Está descrito 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 (BOWERN *et al.*, 1984). Tanjii *et al.* (2001) demonstraram que a DFA aumenta a expressão de cyclooxygenase-2 e prostaglandina em macrófagos humanos. Na infecção experimental por *Candida albicans*, a utilização de DFA promoveu aumento da resposta tipo 1 e diminuição da do tipo 2 (CENCI *et al.*, 1997). Os autores acreditam que a DFA direcionou para um mecanismo efetor do tipo1 que pode ser benéfico na fase inicial das infecções.

Na malária, diferentes trabalhos estudaram os efeitos da DFA. Hershko e Peto mostraram que os efeitos limitantes na proliferação do parasito pela DFA poderiam estar relacionados a outros fatores que não a restrição da disponibilidade de ferro para o patógeno e sugeriram que este resultado benéfico poderia ser devido à modulação imune (HERSHKO & PETO, 1988). Sabe-se que a fagocitose do ferro pelos macrófagos reduz a habilidade em eliminar patógenos, o que pode explicar, em parte, o efeito inibitório do ferro sobre a síntese de IFN- γ pelos macrófagos (WEISS *et al.*, 1992). Ainda, o tratamento com DFA em crianças com malária cerebral resultou na estimulação de vias efectoras de IFN- γ e aumentaram os níveis de nitrito e nitrato no soro, produto estável final do NO (WEISS *et al.*, 1997). Romagnani também demonstrou que a DFA resulta na elaboração de um perfil tipo 1 com o aumento da produção de IFN- γ e formação de NO e diminuição de citocinas do tipo 2 como IL-4 (ROMAGNANI, 1997).

Entretanto, nenhum trabalho examinou os efeitos da DFA na resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*.

Em nossa avaliação, demonstrou-se que o esquema utilizado da DFA (5mg/dia, 35 dias), durante a infecção ou não, não foi capaz de trazer alterações no percentual de células NK⁺, linfócitos CD19⁺, CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos.

Uma vez demonstrado que não houve mudança no perfil linfocitário de células esplênicas, o próximo passo foi verificar se haveria alguma modificação na produção de citocinas por estas células. No tratamento com DFA, observou-se aumento percentual de células NK produtoras de TNF- α em animais infectados e não infectados. Este aumento foi acompanhado pelo aumento de células NK IL-10⁺, observado nos animais infectados. Na vigência da infecção, a DFA também induziu aumento percentual de células CD4⁺ produtoras de IL-10 no 14^o DAI. Considerando o contexto de ausência de infecção, observou-se aumento percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , após 28 dias de tratamento com DFA. Este efeito também foi observado nas células CD8⁺ produtoras de TNF- α . Em relação aos linfócitos B, a DFA induziu queda no percentual de células produtoras de IFN- γ após 28 dias de tratamento, e aumento percentual de células produtoras de TNF- α após 14 e 35 dias de tratamento.

Assim, podemos supor que a DFA direcionou um efeito polarizado, com aumento de IL-10 e diminuição de IFN- γ e TNF- α . Quase nada se sabe sobre o efeito da DFA sobre o sistema imune de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e estes dados poderão levar a um melhor entendimento do mecanismo de ação da DFA.

- A DFA reduz a parasitemia em infecções experimentais de curto e longo prazo.
- A DFA reduz a motilidade do *T. cruzi* e seu crescimento em cultura de fibroblasto.
- O efeito tripanostático da DFA é superior ao efeito tripanocida.
- O uso prolongado de pequenas doses de DFA foi capaz de induzir benefício parasitológico, a princípio livre de interferência no metabolismo do ferro no hospedeiro e na diferenciação hematopoiética e/ou linfopoiética.
- O uso prolongado de pequenas doses de DFA induz efeito polarizado de produção de citocinas.

8- Referências

- ABEL L C, RIZZO LV, IANNI B, ALBUQUERQUE F, BACAL F, CARRARA D, BOCCHI E A, TEIXEIRA H C, MADY C, KALIL J, CUNHA-NETO E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.*, 17(1):99-107, 2001.
- AGUIRRE-IVARADO C, ZARAGOZA-MARTINEZ F, RODRIGUEZ-PAEZ L, NOGUEDA B, BAEZA I, WONG C. In vitro and in vivo trypanocidal activity of the ethyl esters of N-allyl and N-propyl oxamates using different *Trypanosoma cruzi* strains. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.*, 22: 227–233, 2007.
- ALVES T M , ALVES R, ROMANHA A J, ZANI C L, DOS SANTOS M H, NAGEM T J. Biological activities of 7-epiclusianone. *Journal of Natural Products.*, 62:369-371, 1999.
- AMATO NETO, V. Tratamento da Doença de Chagas. *Rev Med.*, 64: 10-14, 1986.
- AMEISEN J C, IDZIOREK T, BILLAUT-MULOT O, LOYENS M, TISSIER JP, POTENTIER A, OUAISSI A. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation.*, 2: 285-300, 1995.
- ANDRADE A L, ZINCKER F. Chronic malnutrition and *Trypanosoma cruzi* infection in children. *J Trop Pediatr.*, 41: 112-115, 1995.
- ANDRADE L O, ANDREWS N W. The *Trypanosoma cruzi*–hostcell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.*, 3:819–823, 2005.
- ANDRADE S G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop.*, 3: 65-121, 1974.
- ANDRADE S G, FILHO A C, DE SOUZA A J M, DE LIMA E S, ANDRADE, Z. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol.*, 78: 391-399, 1997.
- ANTÚNEZ M I, CARDONI R L. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett.*, 79(3):189-96, 2001.
- AOUAD F, FLORENCE A, ZHANG Y, COLLINS F, HENRY C, WARD R J , CRICHTON R R. Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica Chimica Acta.*, 339: 470-480, 2002.
- 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 parasitaemia and mortality in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology.*, 117: 43–50, 2007.
- BALIGA B S, KUVIBIDILA S R, SUSKIND RM. Effect of iron deficiency on the cell mediated immune response. *Ind J Pediatr.*, 49: 431-445, 1982.

- BARNES D, SATO G. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell.*, 22: 649-655, 1980.
- BARRETO P C A, LANNI M B. A forma indeterminada da moléstia de Chagas: conceito e implicações médico-legais. *Rev Soc Cardiol SP.*, 4:129-132, 1994.
- BARROS M F, LEGER C L, LIRA P I, LIMA M C, CARBONNEAU M A, DESCOMPS B, ALESSIO M L. Cord blood essential fatty acid and alpha-tocopherol in full-term newborns in a northeast Brazil area. *Int J Vitam Nutr Res.*, 72: 155-160, 2002.
- BEHARKA A, REDICAN S, LEKA L, MEYDANI, S.N. Vitamin E status and immune function. *Methods Enzymol.*, 282:247-63, 1997.
- BERTELLI M S, GOLGHER R R, BRENER Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. *Journal of Parasitology.*, 63: 434-437, 1977.
- BICE D E, ZELEDON R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J Parasitol.*, 56(4): 663-70, 1970.
- BLAKLEY B R, HAMILTON D L. The effect of iron deficiency on the immune response in mice. *Drug Nutrient Interactions.*, 5: 249-255, 1988.
- BOWERN N, RAMSHAW I A, CLARK I A, DOHERTY P C. Inhibition of autoimmune neuropathological process by treatment with an iron-chelating agent. *J Exp Med.*, 160: 1532-1543, 1984.
- BREIDBACH T, SCORY S, KRAUTH-SIEGEL R L, STEVERDING D. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by iron chelator deferoxamine. *International Journal of Parasitology.*, 32: 473-479, 2002.
- BRENER Z, GAZZINELLI R T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.*, 114(2):103-10, 1997.
- BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.*, 4:389-396, 1962.
- BRENER Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.*, 63, 215-220, 1969.
- BRENER Z. Study of the action of some active drugs against *Trypanosoma cruzi* blood forms. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.*, 13, 302- 306, 1971.
- BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.*, 27:347-82, 1973.
- BUCKNER F S, VERLINDE C L M J, LA FLAMME A C, VAN VOORKHIS W C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -Galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 40, 2592- 2597, 1996.

BUNNAG D A, POLTERA A, VIRAVEN S, LOOAREESUWAN K T, ARINASSUTA, SCHINDLERY C. Plasmocidal effect of desferrioxamine B in human *vivax* or *falciparum* malaria from Thailand. *Acta Tropica.*, 52: 559–567, 1992.

CANÇADO J R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with Benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo.*, 44: 29-37, 2002.

CARDILLO F, POSTOL E, NIHEI J, AROEIRA L S, NOMIZO A, MENGEL J. 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.*, 122:584- 595, 2007.

CARDILLO F, VOLTARELLI J C, REED S G, SILVA J S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: role of NK cells. *Infect. Immun.*, 64:128-134, 1996.

CAROTENUTO P, PONTESILLI O, CAMBIER J C, HAYWARD A R. Desferoxamine blocks IL- 2 receptor expression on human T lymphocytes. *J Immunol.*, 136: 2342-2347., 1986.

CARRASCO R, MIGUEZ H, CAMACHO C, ECHALAR L, REVOLLO S, AMPUERO T, DEDET J P. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in blood banks of seven departments of Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 85(1): 69-73, 1990.

CASTRO J A, DE MECCA M M, BARTEL L C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.*, Aug; 25(8):471-9, 2006.

CENCI E, MENCACCI A, DEL SERO G, BISTONI F, ROMANI L. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J Infect Dis.*, 1: 217-26, 1997.

CHANDRASEKAR B, MELBY P C, TROYER D A, COLSTON J T, FREEMAN G L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.*, 152: 925:934, 1998.

CHIARI E, DIAS J C, LANA M, CHIARI C A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Jan-Mar; 22(1):19-23, 1989.

CINATL J JR, CINATL J, RABENAU H, GUMBEL H O, KORNHUBER B, DOERR, H W. *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication by desferrioxamine. *Antiviral Res.*, 25: 73-77, 1994.

CINATL J JR, CINATL J, WEBER B, RABENAU H, GUMBEL H O, CHENOT J F,; SCHOLZ M, ENCKE A, DOERR H W. *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral Res.*, 27: 405-418, 1995.

COURA J.R., DE CASTRO S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 97: 3-24, 2002.

COURA J R, DIAS J C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz., 1:31-40, 2009.

COURA J R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. Memórias Instituto Oswaldo Cruz., 104, 549-554, 2009.

CUNHA-NETO E, GRUBER A, ZINGALES B, KALIL J. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo., 5:217-229, 1995.

DA SILVEIRA A B, LEMOS E M, ADAD, S J, CORREA-OLIVEIRA R, FURNESS J B, D'AVILA REIS D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. Hum Pathol., 38(8):1256-1264, 2007.

DAMATTA RA, SEABRA S H, DEOLINDO P, ARNHOLDT AC, MANHÃES L, GOLDENBERG S, DE SOUZA W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. FEMS Microbiology Letters., 266, 29-33, 2007.

DE ANDRADE, A.L.; ZICKER, F.J. Chronic malnutrition and *Trypanosoma cruzi* infection in children. Trop Pediatr., 41(2):112-5, 1995.

DE FREITAS BALANCO, J M, MOREIRA M E, BONOMO A, BOZZA P T, AMARANTE-MENDES G, PIRMEZ C, BARCINSKI M A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. Current Biology., 11, 1870-1873, 2001.

DHUR A, GALAN P, HERCBERG S. Iron status, immune capacity and resistance to infections. Comp Biochem Physiol., 94: 11-19, 1989.

DIAS J C. Globalization, inequity and Chagas disease. Cad Saude Publica., 23 :13-22, 2007.

DIAS J C, SILVEIRA A C, SCHOFIELD C J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz., 97(5):603-12, 2002.

DIAS J C P. Epidemiologia. In: BRENER Z, ANDRADE AZ, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan., 48-74, 2000.

DIAS J C P. The indeterminate form of human chronic chagas' disease - a clinical epidemiological review. Rev Soc Bras Med Trop., 22: 147-156, 1989.

DOCAMPO R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interactions., 73: 1-27, 1990.

FALZACAPP M V V, MUCKENTHALER M U. Hepcidin: Iron-hormone and anti-microbial peptide. Gene., 30: 364: 374, 2005.

FERREIRA R C, IANNI B M, ABEL L C, BUCK P, MADY C, KALIL J. Increase plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz., 98(3): 407-411 2003.

- FILARDI L S, BRENER Z. A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz., 79: 221-225, 1984.
- FILARDI L S, BRENER Z. 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, 1987.
- FRAKER P J, CARUSO R, KIERSZENBAUM F. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. J Nutr., 112: 1224-1229, 1982.
- FRANCISCO A F, VIEIRA P M A, ARANTES J M, PEDROSA M L, SILVA M, MARTINS H R, DE LANA M, BAHIA M T, TAFURI W L, CARNEIRO C M. *Trypanosoma cruzi*: effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. Exp Parasitol., 120: 314-319, 2008.
- FRANCISCO A F, DE ABREU VIEIRA P M, ARANTES J M, SILVA M, PEDROSA M L, ELÓI-SANTOS S M, MARTINS-FILHO O A, TEIXEIRA-CARVALHO A, ARAÚJO M S, TAFURI W L, CARNEIRO C M. Increase of reactive oxygen species by desferrioxamine during experimental Chagas' disease. Redox Report., 15: 185-190, 2010.
- GALAN P, DAVILA M, MEKKI N, HERBERG S. Iron deficiency, inflammatory processes and humoral immunity in children. Int J Vit Nutr Res., 58: 225-230, 1988.
- GALVÃO DA SILVA A P, DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN I. Interleukin – 12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol., 104: 349 - 354, 2001.
- GARCIA E S, AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitol Today., 7: 240-244, 1991.
- GIORDANENGO L, GUINAZU N C, STEMPIN R, FRETES F, CERBAN, GEA S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor parasite. Eur J Immunol., 32:1003-1011, 2002.
- GOMES M L, MACEDO A M, VAGO A R, PENA S D, GALVÃO L M, CHIARI E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol., 88: 28- 33, 1998.
- GOMES M L, TOLEDO M J, NAKAMURA C V, BITTENCOURT N D E L, CHIARI E, DE ARAÚJO S M. *Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior. Mem Inst Oswaldo Cruz., 98(5):649-654, 2003.
- GONÇALVES-DA-COSTA S C, LAGRANGE, P H, HURTREL B, KERR I, ALENCAR A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. Ann Immunol., v. 135, n. 3, p. 317-32, 1984.

- GONÇALVES DA COSTA S C, CALABRESE K S, ZAVERUCHA DO VALLE T, LAGRANGE P H. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol Histopathol.*, 17(3):837-44, 2002.
- GORDEUK K, THUMA P, BRITTENHAM G, MCLAREN C, PARRY D, BACKENSTOS E A, BIEMBA G, MSISKA R, HOLMES L, MCKINLEY E, VARGAS L, GILKESON R, POLERA A A. Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *The New England Journal of Medicine.*, 327, 1473-1477, 1992.
- GUARNER J, BARTLETT J, ZAKI S R, COLLEY D G, GRIJALVA M J, POWELL M R. 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, 2001.
- GUEDES P M, VELOSO V M, TAFURI W L, GALVÃO L M, CARNEIRO C.M, LANA M, CHIARI E, ATAIDE S K, BAHIA M T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.*, (84)1:9-17, 2002.
- HATCHER F M, KUHN R E. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by Natural Killer cells. *Science.*, 218: 295 – 296, 1982.
- HERSHKO C, PETO T E A. Deferrioxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *Journal of Experimental Medicine* 168, 375-387, 1988.
- HIGUCHI M D, RIES M M, AIELLO V D, BENVENUTI L A, GUTIERREZ P S, BELLOTTI G, PILEGGI F. 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(5):485-489, 1997.
- HOLSCHER C, KOHLER G, MULLER U, MOSSMANN H, SCHAUB G A, BROMBACHER F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.*, 66 (3):1208-1215, 1998.
- JIANG X, BALDWIN C L. Iron augments macrophage-mediated killing of *Brucella abortus* alone and in conjunction with interferon-gamma. *Cell Immunol.*, 148:397-407, 1993.
- KAMAU S W, NUNEZ R, GRIMM F. Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and the proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacology.*, 1:1, 2001.
- KEBERLE H. The biochemistry of Desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann N Y Acad Sci.*,119:758-768, 1964.
- KENT S, WEINBERG E D, STUART-MACADAM P. Dietary and prophylactic iron supplements: helpful and harmful. *Human Nature.*, 1: 55-81, 1990.
- LAGES-SILVA E, FILARDI L, BRENER, Z. 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, 1990.

- LALONDE R G, HOLBEIN B E. Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *J Clin Invest.*, 23: 470-476, 1984.
- LAUCELLA S A, POSTAN M, MARTIN D, HUBBY FRALISH B, ALBAREDA M C, ALVAREZ M G, LOCOCO B, BARBIERI G, VIOTTI R J, TARLETON R L. Frequency of interferon- gamma producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.*, 289(5): 909-18, 2004.
- LEE P, MOHAMMED N, MARSHALL ABEYSINGHE R D, HILDER R C, PORTER J B, SINGH S. Intravenous infusion pharmacokinetics of desferrioxamine in thalassaemic patients. *Drug Metab Dispos.*, 21: 640-644, 1993.
- LETENDRE E D. The importance of iron in the pathogenesis of infection and neoplasia. *Trends Biochem Sci.*, 12: 166-168, 1985.
- LIMA, M F, VILLALTA F. *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite adhesion molecule. *Mol Biochem Parasitol.*, 33: 159-170, 1989.
- LOO V G, LALONDE R G. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 45., 726-730, 1984.
- LOPES M F, VEIGA V F, SANTOS A R, FONSECA M E F, DOS REIS S G A. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immun.*, 154:744-752, 1999.
- MABEZA G F, BIEMBA G, GORDEUK V R. Clinical studies of iron chelators in malaria. *Acta Haematologica.*, 95: 78-86, 1996.
- MACEDO A M, MACHADO C R, OLIVEIRA R P, PENA S D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99: 1-12, 2004.
- MAHMOUD M S. Effect of deferoxamine alone and combined with pyrimethamine on acute toxoplasmosis in mice. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology.*, 29: 791-803, 1999.
- MARIA T A, TAFURI WL, BRENNER Z. The fine structure of different bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.*, 66, 423-431, 1972.
- MARTELIUS T, SCHOLZ M, KROGERUS L, HOCKERSTEDT K, LOGINOV R., BRUGGEMAN C, CINATL JR J, DOERR H W, LAUTENSCHLAGER I. Antiviral and immunomodulatory effects of desferrioxamine in cytomegalovirus-infected rat liver allografts with rejection. *Transplantation.*, 68: 1753-1761, 1999.
- MARTIN D, TARLETON R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev.*, 201:304-317, 2004.
- MINOPRIO P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol.*, 31(5-6):588-91, 2001.

- MINOPRIO P, EL CHEIKH M C, MURPHY E, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, COFFMAN R, COUTINHO A, O'GARRA A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol.*, 151(8):4200-8, 1993.
- MINOPRIO P, ITOHARA S, HEUSSER C, TONEGAWA S, COUTINHO A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev.*, 112:183-207, 1989.
- MINOTTI G, AUST S D. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* ., 44: 191-208, 1987.
- MONCAYO A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 94: 401- 404, 1999.
- MURTA S M F, ROPERT C, ALVES R O, GAZZINELLI R T, ROMANHA A J. *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, 1999.
- NISHIYA K, HORWITZ D A. Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.*, 129: 2519- 2523, 1982.
- NOGUEIRA N, CHAPLAN S, REESINK M, TYDINGS J, COHN Z A. *Trypanosoma cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. *J Immunol.*, 128: 2142 – 2146, 1982.
- OLIVEIRA R B, VAZ A B M, ALVES R O, LIARTE D B, DONNICI C L, ROMANHA A J, ZANI C L. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, 101:169-173, 2006.
- PADILLA A, XU D, MARTIN D, TARLETON R. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. *Infect Immun.*, 75(1):231-235, 2007.
- PEDROSA M L, SILVA MARCELO E, SILVA MÁRCIO E, SILVA M E C, NICOLI J R, VIEIRA E C. The effect of iron deficiency and iron overload on the evolution of Chagas' disease produced by three strains of *Trypanosoma cruzi* in CFW mice. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, 97: 235-243, 1990.
- PEDROSA M L, NICOLI J R, SILVA MARCELO E, SILVA MÁRCIO E, SILVA M E C, VIEIRA L Q, BAMBIRRA E A, VIEIRA E. The effect of iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Comp Biochem Physiol.*, 106: 813-821, 1993.
- PIACENZA L, PELUFFO G, RADII R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *National Academy Sciences of the United States of America.*, 98: 7301-7306, 2001.

- PINTO P L S, TAKAMI R, NUNES E V, GUILHERME C S, OLIVEIRA JÚNIOR O C, GAMA-RODRIGUES J, OKUMURA M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo., 54(5): 141-146, 1999.
- POSTMA N S, HERMSEN C C, ZUIDEMA J, ELING W M C. *Plasmodium vinckei*: Optimization of desferrioxamine B delivery in the treatment of murine malaria. Experimental Parasitology., 89: 323- 330, 1998.
- PRATA A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis., 1: 92-100, 2001.
- RACHIDI S, COUDRAY C, BARET P, GELON G, PIERRE J L, FAVIER A. Inhibition of lipid peroxidation by a new family of iron chelators. Comparison with desferrioxamine. Biological Trace Element Research., 41, 77-87, 1994.
- RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO J A. Chagas disease. Lancet. , 375:1388-402, 2010.
- REED S G, BROWNELL C E, RUSSO D M, SILVA J S, GRABSTEIN K H, MORRISSEY P J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol., 153(7):3135-40, 1994.
- REIS M M, HIGUCHI M D E L, BENVENUTI L A, AIELLO V D, GUTIERREZ P S, BELLOTTI G, PILEGGI F. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. Clin Immunol Immunopathol., 83(2):165-172, 1997.
- RIBEIRÃO M, PEREIRA-CHIOCCOLA V L, RÉNIA L, AUGUSTO FRAGATA FILHO A, SCHENKMAN S, RODRIGUES M M. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Parasite Immunol., 22(1):49-53, 2000.
- RICHARDSON R D. Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. Annals of the New York Academy of Sciences., 1012: 326-341, 2004.
- RIVERA M T, DE SOUZA A P, ARAUJO-JORGE T C, DE CASTRO S L, VANDERPAS J. Trace elements, innate immune response and parasites. Clin Chem Lab Med., 41: 1020-1025, 2003.
- ROCHA M O, TEIXEIRA M M, RIBEIRO A L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. Expert Review of Anti-Infective Therapy., 5: 727-743, 2007.
- ROMAGNAGI S. The Th1/ Th2 paradigm. Immunol Today., 18: 263-266, 1997.
- ROMANHA A J, DE CASTRO S L, SOEIRO M N C, LANNES-VIEIRA J, RIBEIRO I, TALVANI A, BOURDIN B, BLUM B, OLIVIERI B, ZANI C, SPADAFORA C, CHIARI E, CHATELAIN E, CHAVES G, CALZADA J E, BUSTAMANTE J M, FREITAS-JUNIOR L H, ROMERO L I, BAHIA M T, LOTROWSKA M, SOARES M, ANDRADE S G, ARMSTRONG T, WIM DEGRAVE W, ANDRADE Z A. *In vitro* and *in vivo* experimental

models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, 105: 233- 238, 2010.

ROMANHA A J, ALVES RO, MURTA S M, SILVA J S, ROPERT C,GAZZINELLI R T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis.*, 186(6):823-8, 2002.

ROTTENBERG M E, RIARTE A, SPORRONG L. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.*, 45: 53-60, 1995.

SALEPPICO S, MAZZOLLA R, BOELAERT J R, PULITI M, BARLUZZI R, BISTONI F, BLASI E. Iron regulates microglia cell-mediated secretory and effector functions. *Cell Immunol.*, 170:251-259, 1996.

SATHLER-AVELAR R, LEMOS E M, REIS D D, MEDRANO-MERCADO N, ARAÚJO-JORGE T C, ANTAS P R, CORRÊA-OLIVEIRA R, TEIXEIRA-CARVALHO A, ELÓI-SANTOS S M, FAVATO D, MARTINS-FILHO O A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.*, 58(6): 655-63, 2003.

SCRIMSHAW N S, SANGIOVANNI J P. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr.*, 66(2): 464-477, 1997.

SHADID M, BUONOCORE G, GROENENDAAL F, MOISON R, FERRALI M,; BERGER H M, VAN BEL F. 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, 1998.

SILVA E M, GUILLERMO L V, RIBEIRO-GOMES F L, DE MEIS J, PEREIRA R M, WU Z, CALEGARI-SILVA T C, SEABRA S H, LOPES U G, SIEGEL R M, DOS REIS G A, LOPES M F. Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.*, 174(10): 6314-21, 2005.

SILVERIO J C, DE-OLIVEIRA-PINTO L M, DA SILVA A A, DE OLIVEIRA G M, LANNES-VIEIRA J. Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol.*, 91(1):72-86, 2010.

SOEIRO MN, DE CASTRO S L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion Therapeutic Targets.*, 13: 105-121, 2009.

SOUZA P E, ROCHA M O, MENEZES C A, COELHO J S, CHAVES A C, GOLLOB K J, DUTRA W O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.*, 72(9): 5283-91, 2004.

- SPELLBERG B, EDWARDS J JR, IBRAHIM A. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clinical Microbiology Reviews.*, 18: 556-569, 2005.
- SUMMERS M, JACOBS A, TUDWAY D, PERERA P, RICKETTS C. Studies in desferrioxamine and ferrioxamine in normal and iron-loaded subjects. *Br J Haematol.*, 42: 547-555, 1979.
- TALVANI A, RIBEIRO C S, ALIBERTI J C, MICHAILOWSKY V, SANTOS P V, MURTA S M, ROMANHA A J, ALMEIDA I C, FARBER J, LANNES-VIEIRA J, SILVA J S, GAZZINELLI R T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.*, 2(8):851-66, 2000.
- TALVANI A, ROCHA M O, COGAN J, MAEWAL P, DE LEMOS J, RIBEIRO A L, TEIXEIRA M M. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99(6):645-649, 2004.
- TANJII K, IMAIZUMI T, MATSUMIYA T, ITAYA H, FUJIMOTO K, CUI X F, TOKI, T, ITO E, YOSHIDA H, WAKABAYASHI K, SATOH K. Desferrioxamine, an iron chelator, upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in a human macrophage cell line. *Bioch et Biophy Acta.*, 1530: 227-235, 2001.
- TANOWITZ H B, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS S A, WEISS L M, WITTNER M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews.*, 5: 400-419, 1992.
- TANOWITZ H B, MACHADO F S, JELICKS L A, SHIRANI J, DE CARVALHO A C, SPRAY D C, FACTOR S M, KIRCHHOFF L V, WEISS L M. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.*, 51: 524-539, 2009.
- TARLETON R L, SUN J, ZHANG L, POSTAN M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.*, 62(5):1820-1829, 1994.
- TAYLOR M J, HUGHES B J, SHARMA R P. Dose and time related effects of T-2 toxin on mitogenic response of murine splenic cells *in vitro*. *International Journal of Immunopharmacology.*, 9: 107-113, 1987.
- THIBAUT H, GALAN P, SELZ F, PREZIOSI P, OLIVIER C, BADOUAL J. The immune response in iron-deficient young children: effect of iron supplementation on cell-mediated immunity. *Eur J Pediatr.*, 152: 120-124, 1993.
- TOLEDO M J O, BAHIA M T, CARNEIRO C M, MARTINS-FILHO O A, TIBAYRENC M, BARNABE C, TAFURI W L, DE LANA M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47: 223-30, 2003.

- TOLEDO M J O, TAFURI W L, BAHIA M T, TIBAYRENC M, LANA M. Genetic diversity and drug reistence in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Res Adv in Antimicrob Agents & Chemother., 4: 11-20, 2004.
- TRAORE O, CARNEVALE P, KAPTUE-NOCHE L, BEDE J, DESFONTAINE M, ELION J, LABIE D, NAGEL R L. Preliminary reports in the use of desferrioxamine in the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. American Journal of Hematology., 37: 206-208, 1991
- TURRENS J F, WATTS B P JR, ZHONG L, DOCAMPO R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. Mol Biochem Parasitol., 82(1):125-9, 1996.
- TZELEPIS F, PERSECHINI P M, RODRIGUES M M. Modulation of CD4⁺ T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. PLoS ONE., 2(4):e393, 2007.
- 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. 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, 2000.
- VAN ZANDBERGEN G, BOLLINGER A, WENZEL A, KAMHAWI S, VOLL R, KLINGER M, MÜLLER A, HÖLSCHER C, HERRMANN M, SACKS D, SOLBACH W, LASKAY T. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. National Academy Sciences of the United States of America., 103: 13837-13842, 2006.
- VELOSO V M, CARNEIRO C M, TOLEDO M J, LANA M, CHIARI E, TAFURI W L, BAHIA M T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived fro *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. Mem Inst Oswaldo Cruz., 96(7): 1005-11, 2001.
- WEIEL J E, HAMILTON T A. Quiescent lymphocytes express intracellular transferrin receptors. Biochem Biophys Res Commun., 119: 598-602, 1984.
- WEINBERG E D. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. Physiol Rev., 64: 65-102, 1984.
- WEISS G, THUMA P E, MABEZA G, WERNER E R, HEROLD M, GORDEUK V R.. Modulatory potential of iron chelation therapy on nitric oxide formation in cerebral malaria. J Infection Dis., 175: 226-230, 1997.
- WEISS G, FUCHS D, HAUSEN A, REIBNEGGER G, WERNER E R, WERNER-FELMAYER G, WACHTER H. Iron modulates interferon gamma effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. Exp Hematol., 20:605-610, 1992.
- WILKINSON SR, KELLY J M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Rev Mol Med., 29: 11-31, 2009.

YU Y, WONG J, LOVEJOY D B, KALINOWSKI D S, RICHARDSON D R. Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clinical Cancer Research.*, 12: 6876- 6883, 2006.

ZANNINELI G, GLICKSTEIN H, BREUER W, BRISSOT P, HIDER R C, CABANTCHIK Z I. Chelation and mobilization of cellular iron by different classes of chelators. *Mol Pharmacol.*,51: 842-852, 1997.

ZHANG L, TARLETON R L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol.*, 84: 203-13, 1996.

ZHANG L, TARLETON R L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chaga's disease. *J Infect Dis.*, 180: 480-486, 1999.

