

# ADAPTAÇÃO DE CAMUNDONGOS À DIETA CANÍDEA E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ORGÂNICA EM INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

## ADAPTATION TO DOG DIET IN MICE AND EVALUATION OF ORGANIC RESISTENCE TO INFECTION WITH *TRYPANOSOMA CRUZI*

Cynthia Barbosa Firmino AGUIAR<sup>1</sup>, Helen Silva de OLIVEIRA<sup>2</sup>, Carla da Silva Rodrigues de MENEZES<sup>3</sup>, Humberto Eustáquio COELHO<sup>4</sup>, Adão Divino de AGUIAR<sup>5</sup>, Amélia HAMAGUCHI<sup>6</sup>

**RESUMO:** Camundongos Swiss foram submetidos a duas dietas, convencional (DC) e especial (DE), utilizada para canídeos. Para cada dieta, três grupos com 15, 20 e 30 dias de dieta foram formados e analisados hemograma, bioquímica do sangue e cultura das fezes e infectados com *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Determinou-se a parasitemia do 6º ao 9º dia e a mortalidade até o 60º dia pós-infecção. A dieta não interferiu no hemograma ( $p > 0,05$ ). Os níveis de colesterol e triglicerídeos apresentaram-se mais elevados na DE. A parasitemia e a mortalidade foram menores nos camundongos DE. Histopatologicamente todos os grupos demonstraram inflamação característica de Doença de Chagas crônica. Na coprocultura foram observadas diferenças na flora intestinal entre os animais com DE e DC. A DE melhorou as condições dos animais, propiciando uma maior sobrevida, tornando os camundongos mais resistentes para a fase aguda, quando comparados aos animais do grupo DC.

**UNITERMOS:** *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas; Nutrição/infecção.

### INTRODUÇÃO

A interação entre parasita e hospedeiro pode ser afetada por uma condição nutricional (KEUSCH; FARTHING, 1986). A dieta também pode interferir na composição da flora intestinal, a qual desempenha um papel fundamental na estimulação do sistema imune bem como no fornecimento de alguns nutrientes ao hospedeiro.

Vários tipos de dieta são avaliados para o uso em animais de laboratório. A seleção dependeria da composição nutricional, necessidade de adição de substâncias, efeitos de microrganismos, aceitação pelos animais e custo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC, 1995)

Um dos requisitos básicos para se avaliar a condição nutricional de um animal experimental é o seu bem estar, utilizando-se de respostas fisiológicas e comportamentais (CLARK et al., 1997). As avaliações bioquímicas do sangue, juntamente com outros exames laboratoriais como hemograma, fornecem os principais indícios de uma desnutrição ou de danos (WOO; CANNON, 2000).

A doença de Chagas é uma das endemias mais importantes da América Latina. É grande o número de pessoas infectadas, cerca de 6 milhões no Brasil e entre 16 e 18 milhões em 18 países latino-americanos (WORD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 1991). Tem como

agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário caracterizado por sua notável heterogeneidade morfológica. A cepa Y é de rápida multiplicação, com picos parasitêmicos precoces e elevados e indução de mortalidade máxima entre o 7º e 12º dia de infecção em camundongos. Devido às suas características morfológicas e imunoenzimáticas é classificada como Tipo I (ANDRADE, 1974; ANDRADE et al., 1985; MILES et al., 1980). Várias espécies animais são susceptíveis a infecção com *T. cruzi*, sendo camundongos um dos mais utilizados como modelos experimentais para a doença de Chagas, pelo porte, facilidade de obtenção e manutenção e disponibilidade de diversas linhagens bem caracterizadas (ANDRADE, 2000). Este trabalho teve como objetivo, adaptar camundongos com dieta de canídeos para avaliar a resistência orgânica, frente à cepa Y do *T. cruzi*, na fase aguda da doença de Chagas.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Dieta:** Na dieta convencional (DC) foi utilizada uma ração para roedores (Nuvilab-CR1) e na dieta especial (DE), uma indicada para canídeos (Friskies Alpo—carne e vegetais), as quais foram oferecidas *ad libitum*. Os resultados da análise da composição das rações (proteína

<sup>1</sup> Mestranda, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup> Graduanda, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

<sup>3</sup> Graduanda, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

<sup>4</sup> Professor, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>5</sup> Diretor Técnico, Fitoquímica Hostz Indústria e Comércio Ltda, Uberlândia, MG.

<sup>6</sup> Professora, Doutora, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

Received: 06/12/02    Accept: 03/07/03

bruta, material mineral, matéria fibrosa, cálcio, fósforo, umidade, extrato etéreo) utilizadas bem como a base dos produtos estão apresentadas no Quadro I.

Quadro 1

COMPOSIÇÃO DAS DIETAS		
	DC	DE
Proteína bruta	21,7%	20,6%
Material mineral	7,2%	7,3%
Matéria fibrosa	6,1%	3,7%
Cálcio	1,4%	2,4%
Fósforo	0,9%	1,0%
Umidade	8,0%	8,0%
Extrato etéreo	4,0%	9,5%
Base do produto (conforme fabricante)	Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, NaCl, premix mineral vitamínico, aminoácido	Milho integral moído, arroz, farinha de soja, farinha de carne de frango, farinha de carne bovina, gordura animal estabilizada, hidrolizado de frango, espinafre, cenoura, ervilha, raízes de chicória, sal, suplementos minerais e vitaminas, corantes, cloreto de colina

**Animais:** Foram utilizados camundongos Swiss, machos, padrão sanitário convencional, com 21 dias, originários do biotério da Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação.

**Infecção chagásica:** Foi realizada com cepa Y do *T. cruzi*, proveniente da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (MG) e mantida por sucessivas transferências em camundongos. A infecção foi induzida pela inoculação intraperitoneal de  $6 \times 10^4$  formas sanguíneas. O inóculo foi preparado segundo a técnica de Brener (1962), adaptada de Pizzi (1957), de sangue contaminado citratado, no período de máxima parasitemia.

**Parasitemia:** Foi determinada pela contagem dos parasitas do sangue removido da cauda (BRENER, 1962), do 6º ao 9º dia pós-infecção.

**Coleta e análise do sangue:** hemograma e análise bioquímica (glicose, uréia, creatinina, magnésio, fósforo, bilirrubina total, proteína total, colesterol, triglicerídeos e ferro) foram realizados no sangue coletado de animais no período matutino, por punção cardíaca sob anestesia com éter de petróleo, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

**Análise Histopatológica:** As amostras de tecidos do coração, fígado e intestinos foram fixadas em formol a 10% e colocadas em parafina, seccionadas e coradas em hematoxilina-eosina e em seguida analisadas.

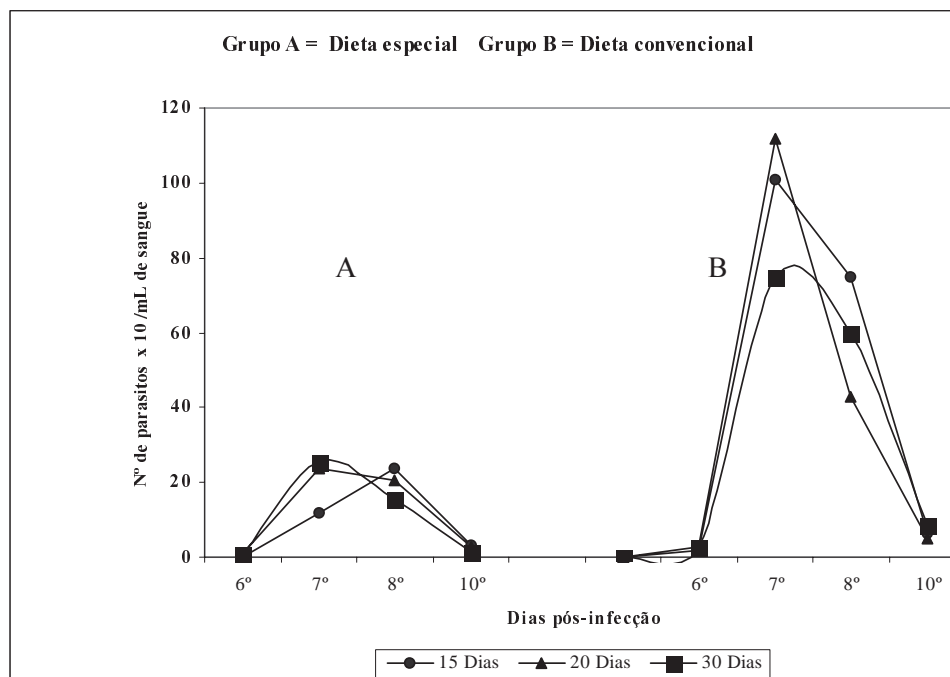
**Análise microbiológica:** As fezes dos animais foram colhidas em tubos contendo meio BHI (Brain Heart Infusion) e colocados na estufa a 37°C por 2 horas, semeadas em ágar sangue, EMB (eosina e azul de metileno), ágar chocolate, SS e incubadas a 36°C. Após 24 horas, as

colônias que cresceram, foram coradas pelo Método de Gram. Para os germes Gram negativos, fez-se série bioquímica {H<sub>2</sub>S, pH, uréia, gás, triptofano, indol (EPM), motilidade, lisina (Mili), citrato, lactose, rafinose, raminose, malonato e ornitina} e para os germes Gram positivo, foram realizadas as provas da catalase, NaCl 6,5%, bacitracina, optoquina para a identificação das espécies encontradas.

**Análises estatísticas:** Os resultados foram analisados pelo Teste-t de Student, ANOVA e Tukey, de acordo com a frequência e homogeneidade dos dados ( $p < 0,05$ ).

**Método experimental:** Trinta e nove animais (39) camundongos com dieta convencional (DC) e trinta e nove (39) com dieta especial (DE) foram divididos em 3 subgrupos ( $n=13$ ). Destes, 10 animais de cada grupo foram infectados com *T. cruzi* ao 15º, 20º e 30º dias após o início da dieta, respectivamente, os quais foram mantidos com a mesma dieta. Imediatamente antes da infecção, as fezes dos animais foram coletadas para exames microbiológicos. Os três animais restantes de cada grupo foram destinados para coleta de sangue antes da infecção. A parasitemia dos animais foi determinada e com a média dos valores diários de cada grupo traçou-se as respectivas curvas parasitemias. A mortalidade foi acompanhada até o 60º dia pós-infecção, quando então os sobreviventes foram sacrificados e removidos fígado, coração e intestinos para análise histopatológica.

**Parasitemia.** Comparando-se as curvas parasitemias dos animais DE e DC, foi observado que a contagem dos parasitos foi menor no grupo de animais DE ( $p < 0,05$ ) no período de máxima parasitemia compreendido entre 7º e 8º dia pós-infecção (figura 1).



**Figura 1.** Curvas de Parasitemia de camundongos determinada do 6º ao 9º dia pós-infecção com *T. cruzi*. Grupo A) Dieta especial iniciada 15, 20 e 30 dias antes da infecção. Grupo B) Dieta convencional iniciada 15, 20 e 30 dias antes da infecção, n=10.

## RESULTADOS

### Análise do sangue:

**Hemograma:** Com exceção do hematócrito e plaquetas, que foram menores nos animais DE em relação aos DC 15 dias ( $p < 0,05$ ), os valores determinados foram estatisticamente iguais. (Tabela 1).

**Bioquímica do sangue:** Comparando-se os animais DE e DC com seus grupos equivalentes, os níveis de glicose, creatinina, proteínas totais, magnésio e fósforo, não foram diferentes. Os níveis de uréia foram menores em todos os grupos dos animais com DE, contrastando com os valores de colesterol que se apresentaram mais elevados nestes animais. A bilirrubina foi maior nos animais do grupo 30 dias DE. Os níveis de triglicérides nos camundongos do grupo DE 20 dias mostraram-se mais elevados. Os níveis de ferro somente foram menores no grupo de animais DE 15 dias (Tabela 1).

**Mortalidade dos animais:** No período máximo observado de 60 dias pós-infecção com *T. cruzi*, a mortalidade dos animais DC foi maior quando comparados aos com DE. Todos os animais com 15 dias DC morreram, enquanto que nos equivalentes com DE, a mortalidade foi de 80%. Já nos camundongos com 20 e 30 dias com DE a mortalidade foi de 40% e nos com DC foi de 90% (Figura 2).

**Histopatologia:** Os resultados nos dois grupos analisados foram uma reação inflamatória identificada pela presença de mononucleares, caracterizando uma miocardite focal disseminada e hiperplasia de células do SMF (Sistema monocítico fagocitário), formando focos disseminados pelo fígado. No intestino mononucleares infiltrando nas vilosidades intestinais, caracterizando uma enterite catarral devido a hiperplasia de células calciformes.

Nos animais com DE o exsudato inflamatório se mostrou mais intenso com mononucleares e polimorfonucleares enquanto que nos com DC ele foi mais discreto com predominância de mononucleares.

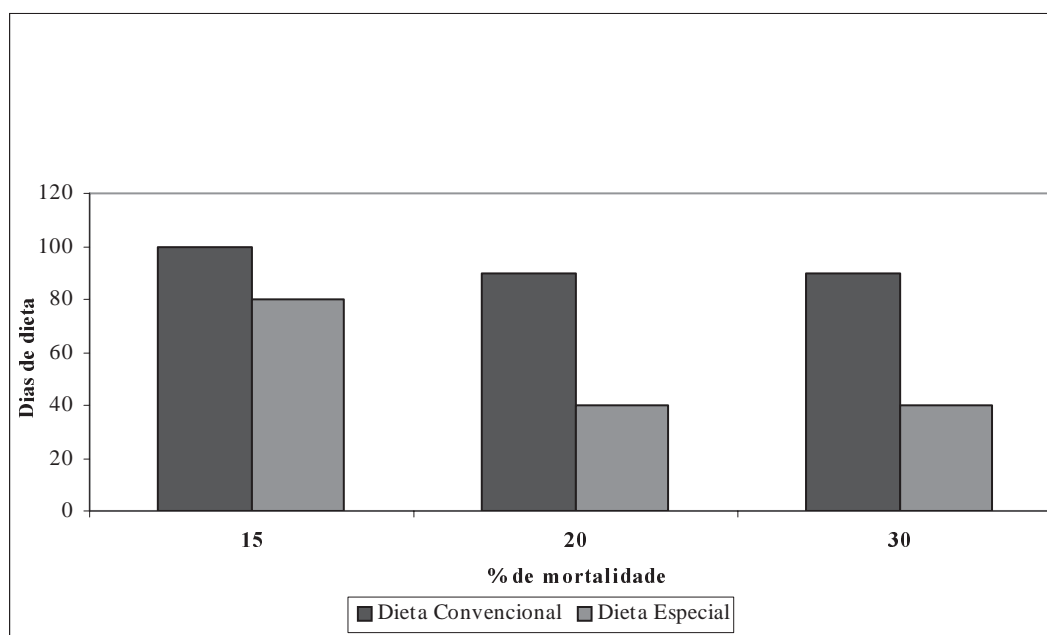
**Análise microbiológica:** Nas culturas em ágar sangue, EMB, ágar chocolate, encontrou-se bastonetes Gram negativo em maior proporção nas fezes dos animais com DC do que nos com DE e cocos Gram positivos em cadeias e duplas somente nas fezes dos animais com DE. Na série bioquímica das bactérias Gram negativas realizada nas fezes dos animais com DC predominaram: *Escherichia coli*, *Serratia rubidinnea*, bactérias Gram negativas não fermentadoras enquanto no grupo DE predominaram *Proteus mirabilis*, *Edwardsiella*, *Enterobacter agglomerans*.

A série bioquímica das bactérias Gram positivas somente foi realizada nas fezes dos animais com DE onde foi encontrada a predominância de *Enterococcus faecalis*.

**Tabela 1.** Hemograma e bioquímica do sangue dos camundongos alimentados com 15, 20 e 30 dias com dieta especial e dieta convencional (antes da infecção com *Trypanosoma cruzi*)

	DIETA ESPECIAL (DE)			DIETA CONVENCIONAL (DC)		
	15 dias	20 dias	30 dias	15 dias	20 dias	30 dias
Hemácias x 10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup>	6,9 ± 0,8	7,5 ± 1,2	7,8 ± 0,4	8,5 ± 0,5	8,4 ± 0,6	8,3 ± 0,6
Hemoglobina g/dl	10,5 ± 0,8	12,6 ± 0,9	13,8 ± 0,9	13,3 ± 1,8	13,2 ± 1,2	15,1 ± 0,9
Hematócrito %	34,4 ± 2,3 *	36,1 ± 2,0	39,8 ± 1,4	44,1 ± 1,1 *	41,0 ± 2,8	47,0 ± 1,4
VCM fl	54,7 ± 0,8	48,4 ± 1,4	55,1 ± 1,1	53,4 ± 4,2	50,0 ± 1,6	57,9 ± 2,9
HCM pg	16,2 ± 0,6	16,5 ± 1,0	18,8 ± 0,3	16,2 ± 0,6	16,4 ± 1,3	18,4 ± 0,9
CHCM g/dl	30,4 ± 1,2	35,3 ± 2,0	33,4 ± 0,8	32,0 ± 1,5	32,6 ± 0,9	32,4 ± 0,8
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup>	108,5 ± 2,4 *	166,1 ± 7,2	146,5 ± 10,3	160,6 ± 10,5 *	171,8 ± 16,4	151,5 ± 20,6
Leucócitos x 10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup>	7,6 ± 0,6	9,2 ± 0,7	7,5 ± 1,3	9,0 ± 0,6	10,7 ± 1,3	9,3 ± 1,1
Linfócitos %	64,0 ± 8,1	76,0 ± 8,2	79,0 ± 5,5	73,0 ± 6,1	76,0 ± 3,6	73,0 ± 4,6
Neutrófilos %	24,0 ± 9,9	13,0 ± 5,6	12,0 ± 3,5	16,0 ± 6,7	12,0 ± 3,5	20,0 ± 4,6
Glicose mg/dl	255,0 ± 6,5	269,0 ± 72,3	206,0 ± 9,7	224,0 ± 6,5	228,0 ± 10,5	176,7 ± 21,7
Uréia mg/dl	35,3 ± 3,0 *	48,7 ± 3,5 *	44,0 ± 3,0 *	63,0 ± 7,5 *	69,0 ± 3,0 *	69,7 ± 4,1 *
Creatinina mg/dl	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Magnésio mg/dl	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,10 ± 0,0
Fósforo mg/dl	8,5 ± 0,5	7,6 ± 0,6	6,8 ± 0,6	7,1 ± 0,7	6,4 ± 0,7	6,9 ± 0,4
Bilirrubina mg/dl	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1 *	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1 *
Proteínas g/dl	3,9 ± 0,4	5,1 ± 0,2	4,2 ± 0,8	4,0 ± 0,4	5,1 ± 0,6	4,4 ± 0,5
Colesterol mg/dl	89,0 ± 4,6 *	101,0 ± 5,7 *	98,0 ± 9,5 *	56,0 ± 7,9 *	76,0 ± 4,3 *	60,0 ± 7,5 *
Triglicérides mg/dl	112,0 ± 5,6	181,0 ± 32,0 *	246,0 ± 22,0	72,3 ± 6,1	111,0 ± 6,1 *	226,0 ± 4,0
Ferro mg/dl	42,0 ± 3,5 *	52,0 ± 5,9	70,0 ± 12,8	62,0 ± 3,0 *	65,0 ± 4,0	60,7 ± 3,0

Média ± desvio padrão \* diferença significativa entre os grupos equivalentes (p&lt;0,05) – Teste de ANOVA e Tukey, n=3



**Figura 2.** Mortalidade dos animais infectados com *T. cruzi* até o 60º dia pós-infecção com dieta iniciada 15, 20 e 30 dias antes da infecção, respectivamente, n=10.

## DISCUSSÃO

Houve assimilação dos nutrientes da dieta especial bem como a aceitação pelos camundongos. No entanto, o organismo desses animais, necessita de um período superior a 15 dias para adaptação à dieta. Isso pode ser observado principalmente frente aos resultados do hemograma, onde os animais alimentados com dieta especial por 15 dias demonstram valores menores de modo geral, em relação aos seus equivalentes com dieta convencional. No entanto, foram voltando a normalidade com o aumento do tempo de dieta, isso também pode ser verificado nas taxas de ferro sérico. Os níveis de uréia se mostraram menores nos camundongos DE do que nos DC. As concentrações séricas de uréia podem variar e dependem da ingestão de proteínas contidas nas dietas e do seu valor biológico (WOO, 2000). A taxa de proteínas se mostrou igual e a de bilirrubina aumentada no grupo DE 20 e 30 dias se comparados aos animais equivalentes, tratados com dieta convencional. Essas diferenças (uréia, bilirrubina) podem ser devidas a um ajuste orgânico nos animais com dieta especial. Em relação aos níveis de colesterol e triglicerídeos na DE a taxa foi maior do que nos animais com DC, isso, provavelmente, foi devido ao excesso de produtos de origem animal e maior quantidade de lipídeos na ração de canídeos.

Os outros elementos sanguíneos analisados não se apresentaram diferentes nos grupos de animais DE e DC.

O fato da ração especial possuir uma variedade maior de nutrientes como base do produto em relação à ração convencional, pode ser um fator que contribuiu para a resistência dos animais. Os níveis protéicos e material mineral, não foram diferentes em quantidade, mas podem

ser diferentes em qualidade. O cálcio, em quantidade maior na DE, é um elemento químico de importância vital nos processos fisiológicos (CAMARGO, 1995).

As fezes e urina apresentaram odores diferentes entre os animais com DE e DC. Nos resultados dos exames microbiológicos das fezes, houve uma diferença entre a flora intestinal dos camundongos que receberam DE e os com DC, mesmo os animais tendo a mesma procedência. Isso confirma que os hábitos alimentares são um dos requisitos básicos para a constituição da microbiota. A função da microbiota, além de estimular o sistema imune e fornecer vitaminas, seria o de suprir enzimas ou influenciar na atividade enzimática no trato gastrointestinal. Portanto, as espécies de bactérias presentes nos intestinos, poderiam levar a uma variação na produção de algumas substâncias, dependendo do seu metabolismo e dos alimentos disponíveis à elas, e assim influenciar também na condição orgânica do hospedeiro, levando a um aumento da resistência dos animais com DE.

Nas análises histopatológicas os animais sobreviventes nos dois grupos estudados, apresentaram inflamação característica da doença de Chagas, no coração, fígado e intestinos. Nos animais com DE essas inflamações foram mais intensas, confirmando os estudos de Andrade (1985), onde maior intensidade da inflamação coincidiu com maior resistência dos animais em testes com diferentes linhagens de camundongos na infecção com o *T. cruzi*.

Estes estudos, portanto demonstram que a DE melhora as condições dos animais, propiciando maior sobrevivência à fase aguda da doença de Chagas. Assim, haveria camundongos mais resistentes na fase aguda, contando-se que a mortalidade dos animais com DC é alta nesta fase da doença, prin-

**ABSTRACT:** Swiss mice were submitted to two diets, conventional (DC) and special (DE), the later used for canine. For each diet the animals were separated in three groups, and after 15, 20 and 30 days of diet they were analysed through hemogram, blood biochemistry and faeces culture, and infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain). Parasitemia was determined from the 6<sup>th</sup> to the 9<sup>th</sup> day post-infection and mortality until to 60<sup>th</sup> day; all animals were necropsied for histopathological analysis. Diet did not interfere in hemogram ( $p>0.05$ ). Cholesterol and triglycerides levels were higher in DE animals. Parasitemia and mortality were lower in DE mice. Histopathologically, all groups showed characteristic inflammatory lesions of chronic Chagas Disease. Coproculture demonstrated differences in the intestinal flora between DE and DC groups. These results suggest that in mice DE promoted an increased resistance in the acute phase of Chagas disease.

**UNITERMS:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, Nutrition/infection.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev. Pat. Trop.** São Paulo, v. 3, p. 65-71, 1974.
- ANDRADE, V.; ANDRADE, S. G.; BARRAL-NETO, M.; PONTES, A. L.; CASTRO, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo, v. 18, p. 143-154, 1985.
- ANDRADE, S. G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo, v.18, p. 39-42, 1985.
- ANDRADE, S. G. Patologia Experimental da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A; BARRAL-NETO, M. (Ed.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p.177-189. 2000.
- BRAGA, M. S.; LAURIA-PIRES, L.; ARGANARAZ, E. R.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 42, p. 157-161, 2000.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 4, p. 389-396, 1962.
- CAMARGO, J. L. V.; RODRIGUES, M. A. M. In: Montenegro, M. R., Franco, M. **Patologia Processos Gerais: Doenças Nutricionais**. 3<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 1995.
- CLARK, J. D.; RAGER, D. R.; CALPIN, J. P. Animal Well-Being. **Lab. Anim. Sci.** v.47, p.564-570, 1997.
- COURA, I.R.; CASTRO, S.L. A critical review in Chagas' disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 97, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PENTANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I Avaliação preliminar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo, v. 30, p. 139-144, 1997.
- KEUSCH, G. T.; FARTHING, M. J. G. Nutrition and infection. **Ann. Rev. Nutr.** v. 6, p. 131-154, 1986.
- LAURIA-PIRES, L.; NITZ, N.; VEXENAT, A. C.; ARGANARAZ, E. R.; D'SOUZA, M.; NASCIMENTO, R. J. The treatment of Chagas disease patients with nitroderivative is unsatisfactory. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 43, p. 175-181, 2001.

MILES, M. A.; LANHAN, S. M.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. Further enzyme identification. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 74, p. 221-237, 1980.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Board an Agriculture, Committee on Animal Nutrition. Sub-committee on Laboratory Animal Nutrition. **Nutrient requerements of laboratory animals**, 4<sup>a</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press, 1995. (Nutrient requeriments of Domestic Animals Series).

PIZZI, T. **Imunologia de la enfermedad del Chagas**. Santiago: Universidad del Chile, 1957.

RASSI, A.; LUQUETTI, A. O. Therapy of Chagas disease. In: WEDEL S., BRENER Z., CAMARGO M. E., RASSI. (Ed.). **American Trypanosomiase: its impact of transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT, 1992. p.237-247.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas' disease**. Geneva, 1991. (Technical Report series, 811:95).

WOO, J.; CANNON, D. C. Intermediários metabólicos e íons inorgânicos. In: SAUNDDERS W. B., (Eds). **Diagnósticos Clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 18 ed. São Paulo: Manole, 2000. p.159-196.