UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da suplementação de zinco e melatonina durante a
infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***

Vânia Brazão

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da suplementação de zinco e melatonina durante a
infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Vânia Brazão

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do
Prado Júnior

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 09/11/2012.

A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

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

Brazão, Vânia

Avaliação da suplementação de zinco e melatonina durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2012.

141p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Do Prado Júnior, José Clóvis.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Zinco. 3. Melatonina. 4. Resposta imune.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Vânia Brazão

Título: Avaliação da suplementação de zinco e melatonina durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus..

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece (Filipenses 4.13)”.

“Por que o senhor Deus é sol e escudo: o senhor dá graça e glória (Salmo 84.11)”.

*Aos meus pais Manoel (in memoriam) e Darci que me deram a vida, exemplos de dignidade,
retidão, amor e carinho.*

*À Ana Lúcia, minha irmã, pelo imenso amor, exemplo de coragem, determinação, e cujo
incentivo foi fundamental.*

*Aos meus irmãos Vanessa, Luciana, Eduardo e Carlos, pessoas muito especiais, com as quais
sempre pude contar! Obrigada pelas alegrias, carinho e torcida positiva.*

Ao Gustavo pela cumplicidade, obrigada por cada gesto de amor e incentivo.

*Aos meus sobrinhos Ana Júlia, João Pedro, Gabriele, Mariângela, Maria Gabriela, Brenda,
Driele, Cássio, e Evandro pelas alegrias, amor e carinho, aos quais desejo um futuro próspero e
repleto de conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior pela oportunidade e confiança a mim depositada. Sua alegria e incentivo foram essenciais para meu crescimento científico, profissional e pessoal. Muito obrigada!

À Míriam Paula Alonso Toldo, agradeço pela ajuda valiosa na execução da parte prática deste trabalho, de grande importância para o desenvolvimento do mesmo.

À Marina Del Vecchio Filipin, obrigada pela presença constante, pelas excepcionais discussões e contribuições, as quais foram absolutamente importantes para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Fabricia Helena Santello, pelas discussões enriquecedoras, cuja competência, sabedoria, incentivo, e carinho foram imprescindíveis.

À Leony Cristina Caetano, pelo carinho e incentivo, que certamente foram muito importantes no início dessa etapa.

À Angela, grande colaboradora deste trabalho, obrigada pelo carinho e atenção sempre dispensados.

À Alana, Bruna, Naty e Nunila obrigada pelo carinho e amizade.

À Prof. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, pelas contribuições na realização deste trabalho, e pelo convívio sempre agradável.

Aos técnicos do laboratório de Parasitologia, Inara, Cristiana e Georgius por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Fabiana Rosseto de Moraes pelos ensinamentos sobre citometria de fluxo e pela enorme contribuição neste trabalho.

À Profa Ana Patrícia, e à funcionária da FCFRP-USP Maraísa Palhão Vérri pela grande colaboração no preparo do extrato parasitário.

À Profa. Cristina de Barros Cardoso e à sua aluna Franciele, pela paciência, disponibilidade e competência, com que compartilharam seus conhecimentos científicos e técnicos, indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP, agradeço a todos sem exceção.

À Simone de Godoy Costa, pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho, e aos colegas da Escola de Enfermagem.

Ao Henrique, funcionário da seção de pós-graduação.

Aos animais utilizados nos experimentos cuja colaboração involuntária foi essencial.

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Abreviaturas e siglas	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Doença de Chagas e o Sistema Imune	5
1.2.1. Resposta imune inata	5
1.2.2. Células T reguladoras	9
1.3. Zinco	10
1.4. Melatonina	16
2 OBJETIVOS	22
3 JUSTIFICATIVA	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Fluxograma de execução dos experimentos	25
4.2. Animais utilizados	26
4.3. Grupos Experimentais	26
4.4. Infecção experimental	27
4.5. Obtenção de antígenos de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	27
4.6. Tratamento com Zinco	28
4.7. Tratamento com Melatonina	28
4.8. Delineamento Experimental	28

4.9	Morte dos Animais e Coleta de Sangue.....	29
4.10	Citometria de fluxo para caracterização fenotípica e funcional de macrófagos e células dendríticas, a partir do lavado peritoneal.....	29
4.11	Quantificação de Óxido Nítrico.....	32
4.12	Preparo da suspensão celular.....	32
4.13	Análise fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo.....	33
4.14	Caracterização de células T reguladoras através da expressão do fator de transcrição Foxp3, por citometria de fluxo.....	36
4.15	Ensaio de proliferação celular.....	37
4.16	Deteção do processo de apoptose por citometria de fluxo.....	37
4.17	Deteção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , e da quimiocina MCP-1.....	40
4.18	Dosagens de IL-2.....	41
4.19	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1.	Avaliação do percentual de macrófagos e expressão de RT1B.....	43
5.2	Quantificação de Óxido Nítrico.....	46
5.3	Avaliação do percentual de células dendríticas e expressão de CD80 e CD86.....	48
5.4	Avaliação do percentual de células NK (CD161 ⁺) e NKT (CD3 ⁺ CD161 ⁺) no baço....	51
5.5	Avaliação do percentual de linfócitos B (CD45RA ⁺).....	53
5.6	Análise das populações celulares do baço por citometria de fluxo.....	54
5.6.1	Análise das sub-populações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	54
5.6.2	Análise da expressão de CD11a e CD28 nas sub-populações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	56
5.7	Caracterização de células T reguladoras (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺).....	59

5.8	Proliferação de esplenócitos.....	62
5.9	Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo.....	64
5.10	Detecção intracelular das citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α	69
5.11	Produção de MCP-1 por células do baço.....	73
5.12	Dosagem de IL-2.....	75
6	DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÃO.....	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

ANEXO

RESUMO

BRAZÃO, V. **Avaliação da suplementação de zinco e melatonina durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***. 2012. 141f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A identificação de moléculas com potenciais ações terapêuticas e a compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune frente à administração de substâncias farmacologicamente ativas em modelos experimentais infectados por *Trypanosoma cruzi* tem contribuído de maneira importante nas investigações de novas terapias para a doença de Chagas. Estudos prévios demonstraram as ações do zinco e da melatonina sobre a imunidade do hospedeiro, durante a fase aguda da infecção chagásica experimental, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita. O presente estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito imunomodulador da administração de zinco e melatonina em ratos Wistar machos durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*, utilizando os seguintes parâmetros: dosagens de citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , e TNF- α , produção de óxido nítrico, proliferação de esplenócitos, citometria de fluxo para análise fenotípica das subpopulações de células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, células dendríticas, células NK (CD161⁺) e NKT (CD3⁺CD161⁺), macrófagos, moléculas co-estimuladoras CD28, CD80 e CD86, RT1B, análise dos marcadores CD11a e CD25 e detecção do processo de apoptose celular. O efeito imuno-modulador do zinco e da melatonina durante a fase crônica da infecção chagásica pode ser comprovado através redução no percentual de macrófagos, células dendríticas, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, apoptose celular, das concentrações de óxido nítrico, IFN- γ e MCP-1. Adicionalmente, a terapia com zinco e melatonina durante a infecção experimental resultou em modificações importantes na resposta imunológica, como evidenciado pelo aumento no percentual de células T reguladoras, da proliferação celular e dos níveis das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que possam modular a resposta inflamatória, contribuindo para prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença, são alvos importantes no tratamento da doença de Chagas.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*; Zinco; Melatonina; Ratos Wistar; Resposta imune

ABSTRACT

BRAZÃO, V. **Evaluation of zinc and melatonin supplementation during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi***. 2012. 141f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The identification of molecules with potential therapeutic actions and the comprehension of the mechanisms involved in modulating the immune response by the administration of pharmacologically active substances in experimental models infected with *Trypanosoma cruzi* have contributed significantly in the investigation of new therapies for Chagas' disease. Previous studies have demonstrated the actions of zinc and melatonin on host's immunity during the acute phase of experimental Chagas' disease, enhancing the immune response generated against the parasite. The present study aimed to evaluate the possible immunomodulatory effect of zinc and melatonin administration in male Wistar rats during the chronic phase of *T. cruzi* infection, using the following parameters: measurement of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF- α , nitric oxide, proliferation of splenocytes, flow cytometry for phenotypic analysis of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells subpopulations, dendritic cells, NK cells (CD161⁺) and NK T (CD3⁺CD161⁺), macrophages, co-stimulatory molecules CD28, CD80 and CD86, RT1B, analysis of markers CD11a and CD25 and detection of the apoptosis process. The immunomodulator effect of zinc and melatonin during the chronic phase of Chagas' disease was evaluated by a reduction of the percentage of macrophages, dendritic cells, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, cellular apoptosis, the concentrations of nitric oxide, IFN- γ and MCP-1. In addition, the treatment with zinc and melatonin during the experimental infection resulted in significant changes in the immune response, as evidenced by the increased percentage of regulatory T cells, cell proliferation and cytokine levels of IL-2, IL-4 and IL-10. The development of new therapeutic strategies that can modulate the inflammatory response, contributing to prevention of tissue damage observed in the chronic phase, are important targets in the treatment of Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Zinc, Melatonin, Wistar rats; Immune response

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da doença de Chagas no mundo, e estimativa de infectados por <i>T. cruzi</i> em países não-endêmicos.....	03
Figura 2: Síntese de melatonina, a partir de pinealócitos.....	16
Figura 3: Estratégia de aquisição de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal, de acordo com as características de tamanho e granulosidade.....	30
Figura 4: Estratégia de aquisição de células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal, de acordo com as características de tamanho e granulosidade.....	31
Figura 5: Seleção da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e granulosidade.....	34
Figura 6: Seleção da população celular de acordo com as características de tamanho e granulosidade.....	35
Figura 7: Seleção da população células esplênicas, para caracterização dos estágios de apoptose.....	39
Figura 8: Avaliação do percentual de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 60º dia após a infecção.....	44
Figura 9: Quantificação de macrófagos, expressando o marcador RT1B (MHC Classe II), obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , no 60º dia após a infecção.....	45

Figura 10: Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**47**

Figura 11: Avaliação do percentual de células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**49**

Figura 12: Análise da expressão das moléculas CD80 (A) e CD86 (B) em células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**50**

Figura 13: Avaliação do percentual de células NK (A) e NKT (B), no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**52**

Figura 14: Avaliação do percentual de linfócitos B (CD45RA^+) em células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**53**

Figura 15: Análise das subpopulações de linfócitos T $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ (A) e T $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ (B) no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**55**

Figura 16: Avaliação do percentual de linfócitos $\text{TCD4}^+\text{CD11}^+$ (A) e $\text{TCD8}^+\text{CD11}^+$ (B) em células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**57**

Figura 17: Avaliação do percentual de linfócitos TCD4⁺CD28⁺ (A) e TCD8⁺CD28⁺ (B) em células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....58

Figura 18: Avaliação do percentual de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ (A) e TCD4⁺CD25^{high} (B) no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....60

Figura 19: Avaliação do percentual de células CD4⁺CD25^{high} e do fator de transcrição Foxp3 no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....61

Figura 20: Avaliação da proliferação de esplenócitos, estimulados ou não com ConA (4µg/mL), de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....63

Figura 21: Marcação de células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, com anexina V e iodeto de propídeo.65

Figura 22: Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/ml), com anexina V e iodeto de propídeo em ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.....67

Figura 23: Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/ml), com anexina V e iodeto de propídeo em ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1x10⁵ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.....68

Figura 24: Análise da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**70**

Figura 25: Análise da produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**72**

Figura 26: Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD4⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**73**

Figura 27: Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD8⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**74**

Figura 28: Concentrações de IL-2 (pg/mL) determinadas no soro ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção.....**76**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HTP	5-hidroxitriptofano
AAAD	Enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AANAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
ANOVA	Oneway analysis of variance
APC	Aloficocianina (<i>Allophycocianin</i>)
APCs	Células apresentadoras de antígenos
Bcl-2	Célula B de linfoma 2 (<i>B cell lymphoma-2</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
C	Controle
Ca²⁺	Cálcio
CD	Grupos de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD3	Marcador de superfície celular da população de linfócitos T
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD11a	Molécula de adesão ao endotélio, família das integrinas (LFA-1)
CD25	Cadeia α do Receptor para a Interleucina-2
CD28	Marcador de superfície celular para molécula coestimulatória
CD45RA	Marcador de superfície celular da população de linfócitos B
CD80	Molécula co-estimuladora ou B7.1, presente em monócitos
CD86	Molécula co-estimuladora ou B7.2, presente em monócitos e células dendríticas
CD161	Marcador de superfície celular da população de células NK

CM	Controle tratado com Melatonina
ConA	Concanavalina A
CO₂	Dióxido de carbono
CTLA-4	Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (<i>T Lymphocyte-Associated Protein 4</i>)
CZ	Controle tratado com Zinco
CZM	Controle tratado com Zinco e Melatonina
Cy	Cy-chrome
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isotiocyanate</i>)
FSC	Tamanho celular
Foxp3	Fator de transcrição (<i>X Chromosome-Encoded Forkhead Transcription Factor</i>)
GPI	Glicosifosfatidilinositol
GITR	Glucocorticoid-Induced TNRF-Related Protein
HIOMT	Enzima hidroxí-indol-orto-metiltransferase
I	Infectado
IFN-γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IM	Infectado tratado com Melatonina
IZ	Infectado tratado com Zinco
IZM	Infectado tratado com Zinco e Melatonina
iNOs	Óxido Nítrico Sintase Induzida
iTregs	Células reguladoras induzidas

LPS	Lipopolissacarídeo
mAbs	Anticorpos monoclonais
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
MHC	Complexo principal de Histocompatibilidade
MT	Receptores metabotrópicos de melatonina
NK	Célula natural killer
NKT	Célula natural killer T
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina (<i>r- phicoeritrin</i>)
PERCP	Complexo protéico clorofila-peridina (Peridin clorofil protein)
PI	Iodeto de propídeo
PMA	Forbol -12- miristato -13- acetato
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i>
RPMI	Meio de cultura (<i>Roswell park memorial institute</i>)
SBF	Soro Bovino Fetal
TCR	Receptor de linfócito T (<i>T cell receptor</i>)
Th	T Helper
Th3	Células reguladoras produtoras de TGF- β
TGF-β	Fator Transformador do Crescimento Beta Tipo I
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMB	Tetrametilbenzidina

TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPH1	Enzima triptofano hidroxilase
Tr1	Células reguladoras produtoras de IL-10
Tregs	T Reguladoras
ZnSO₄	Sulfato de Zinco
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma das mais sérias doenças parasitárias da América Latina. Dados recentes indicam que cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas por *Trypanosoma cruzi* no mundo, e cerca de 25 milhões correm o risco de serem infectadas. A importância dessa endemia se reflete no sentido econômico, onde é responsabilizada por taxas de aposentadoria precoce, bem como elevados custos médico-hospitalares como consequência direta da doença (WHO, 2010).

Descrita por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, a tripanossomíase americana tem por agente etiológico o flagelado digenético *T. cruzi*. As formas mais comuns de contágio da doença de Chagas humana incluem a transmissão vetorial, produzida pelo contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*. A presença maciça de tripomastigotas sanguícolas fruto da divisão binária das amastigotas intracelulares caracteriza a fase aguda da doença.

Em condições naturais, *T. cruzi* se encontrava restrito ao ambiente silvestre, circulando entre mamíferos no ambiente natural, por meio do inseto vetor. O homem passou a fazer parte deste ciclo epidemiológico quando invadiu esses ecótopos, oferecendo novas opções de disseminação ao vetor (DIAS, COURA, 1997). Os triatomíneos hematófagos encontraram nas habitações, condições ideais de abrigo e oferta alimentar abundante, tornando a transmissão vetorial o mecanismo primário de difusão da doença. Esta adaptação pode ser considerada um fator primordial na expansão da doença de Chagas humana.

Os triatomíneos possuem hábitos geralmente noturnos, e durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerem os tripomastigotas circulantes, os quais após

multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo destes, são eliminados em suas fezes podendo infectar novos hospedeiros vertebrados.

Medidas de controle dos insetos vetores foram adotadas com sucesso, apresentando importante impacto na redução dos casos, e permitindo que o Brasil obtivesse em 2006, Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas por *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde. No entanto, existem relatos da capacidade de repovoamento de *T. infestans* quando da interrupção de ações regulares de controle e vigilância (FERREIRA, SILVA, 2006).

Além da transmissão vetorial da doença, mecanismos secundários foram estabelecidos, tais como a transmissão congênita (BITTENCOURT, 1999; CARLIER et al., 2012), amamentação, via transfusional (MONCAYO, YANINE, 2006), acidentes de laboratório, transplante de órgãos e transmissão sexual (CHIEFFI, AMATO NETO, 2000; CDC, 2006; DIAS, AMATO NETO, 2011). Recentes surtos no sul do Brasil e no Pará demonstram a importância da transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com o parasita (PEREIRA et al., 2009; YOSHIDA, 2009).

Nas últimas décadas, casos de doença de Chagas humana vêm sendo detectados em outros continentes, em razão da migração de indivíduos infectados, viabilizando a disseminação da doença nos países desenvolvidos (DIAS, COURA, 1997), que até então não estavam capacitados para identificar pacientes chagásicos em circunstâncias como: transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e transmissão congênita. Existem casos notificados da doença em países considerados não endêmicos (figura 1), tais como Espanha, Estados Unidos e Austrália. Estimativas demonstraram que em 2006, 3.8% (3088) dos 80.522 imigrantes latino-americanos que foram para a Austrália estavam infectados por *T. cruzi*, dos quais 618 necessitaram de monitoramento médico como consequência da infecção. Dados do mesmo ano ressaltam que no Canadá, 3.5% (5553) dos 156.960 imigrantes também estavam infectados (SCHMUNIS, YADON, 2010). Países com índices significativos de infecção por *T. cruzi* incluem Itália (5185 casos), Alemanha (2225 casos),

Portugal (1617 casos) e Reino Unido (1373 casos). Estima-se que nos Estados Unidos estejam vivendo 332.000 pessoas infectadas com *T. cruzi* (SCHMUNIS, YADON, 2010). Na figura abaixo observa-se a distribuição da doença de Chagas no mundo e a estimativa de infectados em países não-endêmicos.

Figura 1: Distribuição da doença de Chagas no mundo e estimativa de infectados por *T. cruzi* em países não-endêmicos. Fonte: COURA, VIÑAS, 2010.

Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção é controlada através da resposta imune dirigida contra o parasita, determinando o desaparecimento das formas tripomastigotas do sangue. Parte desses indivíduos passa para uma fase assintomática, onde somente exames sorológicos podem indiretamente detectar o parasita. Vários anos após a infecção, dependendo do tipo de cepa e estado imunológico do hospedeiro, dentre outros fatores, cerca de 30% dos indivíduos infectados desenvolvem manifestações cardíacas e/ou digestivas, enquanto a maioria permanece assintomática (GARCIA et al., 2005). Durante a fase crônica da infecção humana por *T. cruzi*, a positividade ou ausência da doença são detectadas através de reações sorológicas como: análise de IgG (MONCAYO, YANINE, 2006), hemaglutinação indireta, imunofluorescência, exames de isolamento do parasita tais como xenodiagnóstico, hemocultura e mais recentemente

através da biologia molecular com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RUSSOMANDO et al., 1998; GALVÃO et al., 2003).

T. cruzi demonstra uma patogenia especialmente determinada por características próprias do hospedeiro e da população infectante. Assim, o curso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores tais como: temperatura ambiental, idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas e morfológicas da cepa infectante (BRENER et al., 2000).

T. cruzi, por suas características biológicas e genéticas, constitui-se de cepas que podem ter comportamentos peculiares quando inoculadas em animais experimentais (BRENER, CHIARI, 1963). ANDRADE et al. (1970), relataram a existência de cepas com predominância de formas delgadas e tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea, apresentando altos e precoces picos parasitêmicos. Entretanto, existem cepas que apresentam característica morfológica larga, com marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (MELO, BRENER, 1978). Esse tipo de conformação morfológica confere a esta cepa uma maior resistência aos anticorpos circulantes, e como consequência, as formas tripomastigotas permanecem por mais tempo na corrente circulatória, determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente por meio do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, incluindo roedores silvestres (BORGES et al., 1982; BORGES et al., 1992; PRADO JÚNIOR et al., 1998; PRADO et al., 1999; CAETANO et al., 2006; DOST et al., 2006), camundongos (CARDILLO et al., 1996) e ratos (SANTELLO et al., 2007; SANTOS et al., 2007a; BRAZÃO et al., 2008a), podendo reproduzir nos mesmos, os distintos aspectos patológicos da doença humana. Com relação ao estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados por *T.*

cruzi, observou-se incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, muito semelhante às causadas pela doença humana (BRENER et al., 2000).

1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune

1.2.1 Resposta imune inata

A infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita, fato de extrema importância na redução da carga parasitária (ALIBERTI et al., 1996).

A resistência do hospedeiro durante a infecção experimental por *T. cruzi* depende da imunidade inata e da adquirida, que requer esforços combinados de células que incluem macrófagos, células natural killer (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como a produção de anticorpos por células B (BRENER, GAZZINELLI, 1997; MARTIN, TARLETON, 2004).

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos e células dendríticas, por *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI et al., 1996). O reconhecimento e ativação destas células pelo parasita baseiam-se na identificação de estruturas moleculares conservadas, denominadas PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002), por diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs - *pattern-recognition receptors*). Dentre os receptores PRRs, destacam-se os *Toll Like-receptors* (TLRs), os quais compõem a mais bem caracterizada classe de receptores (TAKEDA, AKIRA, 2005).

Os TLRs são uma família de proteínas transmembrânicas expressas em diferentes tipos de células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais mucosas e células endoteliais. Foram descritos, até o

momento, doze diferentes receptores desta família em camundongos e dez em humanos, sendo que cada um deles reconhece padrões moleculares distintos (KAWAI, AKIRA, 2010).

Dentre os membros da família TLR, o TLR-2 é um dos principais receptores envolvidos na indução da resposta imune inata durante a infecção causada por *T. cruzi*. De acordo com Campos et al. (2001), ancoras de GPI da superfamília de mucinas, distribuídas pela superfície da membrana celular de formas tripomastigotas, são reconhecidas por TLR-2 e induzem a produção de IL-12, NO e TNF- α por macrófagos. Além disso, outra proteína derivada de *T. cruzi*, a Tc52, também é considerada uma potente indutora da resposta imune inata via TLR-2, pois ativa a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas co-estimulatórias, que participam do recrutamento de células para o foco da infecção. A complexa interação das respostas mediadas pelos receptores TLRs é fundamental para o início e direcionamento adequado da imunidade adaptativa.

A apresentação de antígenos por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presentes nas células da imunidade inata é o mecanismo responsável pela interação entre a resposta imune inata e a adaptativa. No entanto, para que ocorra a completa ativação dos linfócitos, estas células precisam de sinais co-estimuladores provenientes das células apresentadoras de antígenos (APCs) durante o reconhecimento antigênico. Dentre as moléculas co-estimulatórias, a molécula CD28 presente constitutivamente nos linfócitos T interage com as moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), de expressão indutível na superfície das células APCs (FELONATO et al., 2010). A indução da expressão das moléculas B7 pela ligação dos receptores TLRs com PAMPs é um processo fundamental na ativação do sistema imune adaptativo.

Além dos receptores responsáveis pelo reconhecimento de patógenos durante a resposta imune inata, deve-se ressaltar que a síntese de quimiocinas também exerce um importante papel no recrutamento e direcionamento de células, tanto nos processos inflamatórios agudos quanto nos crônicos. Os TLRs ao reconhecer padrões moleculares conservados (PAMPs) expressos por diversos patógenos, tais como bactérias, vírus, fungos

e protozoários (AKIRA et al., 2006; KAWAI, AKIRA, 2010), desencadeiam um mecanismo de sinalização intracelular que culmina na ativação de macrófagos, com consequente morte do microrganismo, processo este, que ocorre principalmente através da produção de citocinas, quimiocinas e da indução da biossíntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

O óxido nítrico (NO), um dos mais importantes intermediários reativos de nitrogênio, é considerado um dos principais indutores da atividade microbicida dos macrófagos (VESPA, et al., 1994). Os macrófagos quando ativados liberam NO, que está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, tais como relaxamento da musculatura lisa vascular, agregação de plaquetas, e neurotransmissão (MONCADA et al., 1991; MONCADA, HIGGS, 2006). É uma molécula efetiva contra patógenos intracelulares tais como *T. cruzi*, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA, ZILBERSTEIN, 2000; AKAMINE et al., 2007; MARCACCINI et al., 2007).

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, NO e produção de peroxinitrito. Este último demonstrou-se altamente citotóxico contra as formas epimastigotas desse parasito (THOMSON et al., 1999). O NO é sintetizado pela reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, através da atividade catalítica da enzima NO sintase (NOS), a qual existe em 3 isoformas, que diferem na sua localização celular e expressão, sendo: constitutiva, induzida e neuronal (QUEIROZ, BATISTA, 1999). A NOS₂, também conhecida como óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), é produzida por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células NK, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliais, miócitos e fibroblastos (VESPA et al., 1994). A expressão de iNOS se faz em resposta a diferentes estímulos, tais como IL-1, IFN- γ , TNF- α e outros produtos bacterianos (LPS), os quais aumentam a sua expressão, sendo que glicocorticóides, IL-4, IL-10, e TGF- β , entre outros, são responsáveis por sua inibição (MAYER, HEMMENS, 1997).

O NO produzido atinge a luz vascular e reage com a oxihemoglobina das hemácias, transformando-se rapidamente em nitrito, que em seguida é oxidado a nitrato, composto

este biologicamente inativo (WANG et al., 2004). A determinação de NO em amostras biológicas constitui um desafio, visto que este composto apresenta baixo tempo de meia-vida, cerca de quatro a seis segundos no plasma e dez a sessenta segundos nos tecidos (KIECHLE, MALINSKI, 1993). Um dos métodos utilizados para monitorar a produção indireta de NO é através da quantificação de seus metabólitos, nitrito e nitrato (LAUER et al., 2002).

O IFN- γ , produzido por células NK e células T ativadas, estimula eficientemente a fusão do fagossoma com o lisossoma e a expressão do MHC de classe II (complexo principal de histocompatibilidade) nos macrófagos, efetivo na contenção da replicação intracelular (*in vivo* e *in vitro*) do parasita através da indução da biosíntese de NO por macrófagos ativados (ALIBERTI et al., 1996). O papel protetor do IFN- γ no início da infecção foi amplamente demonstrado por REED em 1995. Esses estudos foram confirmados utilizando camundongos suscetíveis à infecção, geneticamente deficientes do IFN- γ (ROTTENBERG et al., 1996). Por outro lado, determinadas citocinas tais como a interleucina 10 (IL-10), podem inibir a ativação de macrófagos induzida por IFN- γ , inibindo tanto a liberação de NO quanto a diferenciação de células Th1 (SILVA et al., 1992; ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1996).

Com a mobilização efetiva da resposta imune durante a fase aguda, ocorre redução significativa da carga parasitária sanguínea, com consequente diminuição de ninhos teciduais. Porém, tal resposta não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro (BRENER et al., 2000), o que contribui para o aparecimento das manifestações crônicas (BUSTAMANTE et al., 2007).

1.2.2 Células T reguladoras

Dentre os vários componentes imunológicos envolvidos na infecção por *T. cruzi*, as células NKT e células TCD4⁺CD25⁺ regulatórias (Tregs) são também mediadores centrais na resposta imune, suprimindo uma série de células efetoras e contribuindo para a manutenção da homeostase imunológica (SAKAGUCHI et al., 2008; SAKAGUCHI, 2011).

Descritas em roedores (SAKAGUCHI et al., 1995) e humanos (DIECKMANN et al., 2001; TAAMS et al., 2001), as células Tregs constituem 5-10% dos linfócitos TCD4⁺ periféricos, sendo fundamentais para a manutenção da tolerância imunológica, prevenindo a ativação e a proliferação de linfócitos T auto reativos (MIYARA, SAKAGUCHI, 2011).

As células Tregs são caracterizadas pela expressão constitutiva das moléculas Foxp3, GITR, CTLA-4, e caracteristicamente CD25 que é o receptor α da IL-2 (SAKAGUCHI, POWRIE, 2007). Foxp3 é um fator exclusivamente expresso nas células T reguladoras, sendo crucial para o desenvolvimento e para sua função reguladora, cuja principal ação é reprimir vários sinais de ativação das células TCD4⁺ (HORI et al., 2003; KHATTRI et al., 2003; GAVIN et al., 2007; MARIANO, et al., 2008). Mutações no gene Foxp3 culminam no desenvolvimento de doenças linfoproliferativas fatais (BENNETT et al., 2001; WILDIN et al., 2002), ressaltando a importância deste fator de transcrição como fundamental no desenvolvimento das células Tregs. Adicionalmente, camundongos deficientes de Foxp3 são incapazes de gerar Tregs (FONTENOT et al., 2003).

Com base na origem, geração e mecanismo de ação, as células Tregs com função imunorregulatória podem ser divididas em duas categorias gerais: as células Tregs de ocorrência natural e as induzidas. Ao contrário das células de ocorrência natural que se originam no timo (SEDDON, MASON, 2000) e regulam células T auto-reativas na periferia, as células reguladoras induzidas ou iTregs originam-se na periferia a partir de células TCD4⁺ e dependem de citocinas, tais como IL-10 ou TGF- β para exercerem supressão. Células Tregs produtoras de IL-10 são referidas como células Tr1 e suprimem algumas respostas de

células T *in vivo*. As células Th3 são capazes de suprimir a resposta imunológica mediante a produção de TGF- β . A relevância destas populações celulares tem sido claramente demonstrada em recentes estudos, estabelecendo o importante papel das células Tregs na regulação das respostas imunes fisiológicas, bem como o seu envolvimento em doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas e auto-imunes.

VITELLI-AVELAR e colaboradores (2005) observaram que indivíduos chagásicos apresentando a forma indeterminada da doença, tinham significativamente mais células reguladoras (Tregs) e NKT e um número reduzido de células CD8⁺ ativadas, quando comparados a indivíduos portadores da forma cardíaca. Resultado similar foi encontrado por ARAÚJO e colaboradores (2007), em que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas indeterminada mostraram maior frequência de células CD4⁺CD25⁺ quando comparados a pacientes portadores das formas digestiva e cardíaca. Estudos mais recentes desenvolvidos pelos mesmos autores (DE ARAÚJO et al., 2011) evidenciaram que esses pacientes assintomáticos, infectados por *T. cruzi* e que não desenvolviam nenhuma manifestação clínica da doença de Chagas, expressavam níveis maiores de Foxp₃ em relação a pacientes com comprometimento cardíaco.

1.3 Zinco

O zinco é um elemento traço essencial, que participa do metabolismo de carboidratos e proteínas, da síntese de ácidos nucleicos e outras funções vitais. É um elemento de extrema importância para manutenção de várias funções fisiológicas, incluindo crescimento, desenvolvimento e reprodução (VALLEE, FALCHUK, 1993). É um oligoelemento essencial para a integridade funcional e estrutural das células e está envolvido na redução do estresse oxidativo e inibição da apoptose (YOUSEF et al., 2002).

Trabalhos prévios mostraram que a deficiência severa de zinco causa retardo do crescimento em ratos (VALLEE, FALCHUK, 1993). TOMAT et al. (2008) observaram que

animais submetidos à deficiência moderada de zinco durante a vida fetal e período da lactação apresentavam menor peso corporal no momento do nascimento. RAULIN (1869) descobriu que o zinco é fundamental para o crescimento de *Aspergillus niger*. TODD et al. (1934) realizaram os primeiros trabalhos documentando a essencialidade deste elemento para o crescimento e a sobrevivência de animais. No entanto, o papel essencial do zinco em humanos foi reconhecido somente em 1963 (PRASAD et al., 1963).

Nos últimos anos, a deficiência de zinco tornou-se um problema nutricional presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, levando a inúmeras anormalidades no metabolismo. Como possíveis causas pode-se citar a ingestão dietética inadequada, diminuição na absorção ou aumento na excreção urinária, presença de agentes da dieta que comprometem sua absorção, doenças gastrintestinais crônicas, síndromes de má-absorção, doenças renais, doenças hepáticas crônicas, câncer, diabetes, uso abusivo de álcool, nutrição parenteral total sem adição de zinco, alterações genéticas (acrodermatite enteropática), além de outras doenças crônicas (PRASAD, 1996; TUDOR et al., 2005). Os sintomas observados na deficiência deste elemento incluem lesões de pele, dificuldade de cicatrização, anorexia, retardo do crescimento, hipogonadismo e alterações na função imune (IBS, RINK, 2003), efeitos estes que podem ser revertidos pela suplementação com zinco (PRASAD, 1995; PRASAD, 2007).

O conteúdo total de zinco no organismo humano varia de 2-4 gramas. É denominado elemento traço, pois no plasma sua concentração varia de 12-16 μM , com taxas variando de 10,1-16,8 μM em mulheres, e 10,6-17,9 μM nos homens. No soro, o zinco encontra-se predominantemente ligado a albumina (60%), α 2-macroglobulina (30%) e transferrina (10%) (SCOTT, BRADWELL, 1983), mas somente o zinco livre parece ser biologicamente ativo (GLESS et al., 1992; VALLEE, FALCHUK, 1993).

A maior concentração de zinco encontra-se localizada no interior das células, sendo que no organismo não existem sistemas para armazenamento deste metal. Portanto, alterações na ingestão, ou na secreção podem levar rapidamente à deficiência de zinco e

afetar as funções zinco-dependentes em vários tecidos, particularmente aquelas relacionadas ao sistema imune (HAASE et al., 2006). O zinco está presente nos músculos (60%), ossos (30%) e outros órgãos (10%), que incluem fígado, rins, pâncreas, cérebro, pele, próstata, entre outros (FAVIER, FAVIER, 1990).

A biodisponibilidade de zinco depende da composição da dieta (RINK, GABRIEL, 2000). As principais fontes de zinco são os produtos de origem animal tais como ostras, fígado, carne bovina, carnes de aves, caranguejo e ovos. Embora a absorção de zinco nos vegetais seja menor, os grãos, trigo e o germe de trigo também constituem importantes fontes de zinco (SANDSTRÖM, 1997).

Entre os fatores nutricionais que mais afetam a biodisponibilidade do zinco, encontra-se o fitato (Hexafosfato de inositol). Estudos realizados em humanos demonstram que os fitatos apresentam uma potente capacidade de ligação com cátions divalentes, com os quais formam complexos insolúveis em baixo pH, podendo prejudicar a absorção de zinco. Este fenômeno é intensificado na presença de cálcio, gerando um complexo cálcio-fitato-zinco, ainda mais insolúvel. Em dietas ricas em cereais integrais e leguminosas, que contêm teores elevados de fitatos, a absorção de zinco é menor que 15% (SANDSTRÖM, 1997). No entanto, o efeito do fitato pode ser modificado a partir da fonte e da quantidade de proteínas consumidas na dieta. As proteínas de origem animal, por exemplo, parecem neutralizar o efeito inibitório do fitato na absorção de zinco, atribuindo-se isto, possivelmente, aos aminoácidos liberados da fração protéica do alimento, responsáveis pela manutenção do zinco em solução (FAO, WHO, 2002).

A dose diária recomendada de zinco deve ser ajustada de acordo com as características de cada organismo, visto que a concentração de zinco é regulada não somente pela ingestão, mas também por flutuações na excreção, as quais podem estar associadas com várias doenças ou com inflamação (WEISS et al., 1998). Segundo Weiss et al. (1995) a diminuição dos níveis de zinco observada principalmente durante a fase aguda

de algumas doenças infecciosas e processos inflamatórios crônicos, funciona como um mecanismo de defesa do organismo.

O zinco age como um inibidor da apoptose celular (SUNDERMANN, 1995; TRUONG-TRAN et al., 2001), coordenando a seleção fisiológica de células intra-tímicas (TREVES et al., 1994; PROVINCIALI et al., 1995). JIANG et al. (1995) e UMEZAWA et al. (1999) evidenciaram que a quelação de zinco em meio de cultura levava a apoptose e sua adição protegia as células da apoptose. Foi demonstrado que o zinco tem a capacidade de manter tal efeito protetor mesmo se adicionado após curtos períodos depois de agentes indutores de apoptose, tais como TNF- α e radiação γ (ZALEWSKI, FORBES, 1993). Possíveis mecanismos para este efeito anti-apoptose do zinco incluem: inibição da caspase 3 (fator pró-apoptose), interação direta com Bcl-2 (fator que previne a apoptose), indução da síntese de DNA (WYLLIE, 1980; FUKAMACHI et al., 1998; ISHIDO et al., 1999; MARET et al., 1999) e inibição da endonuclease $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependente, a qual é responsável pela fragmentação do DNA observada nas células que passam por apoptose (ZALEWSKI, FORBES, 1993).

Este oligoelemento é considerado um componente nutricional de extrema importância, sendo crítico para a integridade estrutural e funcional das células, contribuindo em processos biológicos importantes tais como expressão genética, síntese de DNA, catálise enzimática, armazenamento e liberação de hormônios, neurotransmissão, memória e processos visuais (VALLEE, FALCHUK, 1993). É ativo em uma variedade de funções celulares, incluindo sinal de transdução, transcrição e replicação (VALLEE, FALCHUK, 1993). Age influenciando o crescimento, afetando o desenvolvimento e integridade do sistema imune (DARDENNE, 2002), tanto na imunidade inata quanto na adquirida (FRAKER et al., 2000), através da ação em mediadores imunes como enzimas, peptídeos e citocinas (DARDENNE, 2002).

Sabe-se que o zinco é componente de mais de 300 metaloenzimas, que não funcionam na sua ausência, sendo essencial para a função da DNA polimerase, timidina

quinase e RNA polimerase DNA dependente, cujo envolvimento na síntese de ácidos nucleicos pode explicar o efeito do zinco na proliferação das células linfóides (FRIEKE, 2000). A timulina, hormônio nonapeptídico secretado pelas células epiteliais tímicas, que promove a maturação dos linfócitos T, citotoxicidade e produção de IL-2, requer a presença do zinco para exercer sua atividade biológica (DARDENNE et al., 1982; HADDEN, 1998). Tem sido demonstrado que a produção ou atividade biológica de IL-2 e IFN- γ são afetadas pela deficiência de zinco. Como citado anteriormente, a deficiência de zinco em humanos afeta a produção de citocinas Th1 levando a um desequilíbrio entre células Th1 e Th2 (SHANKAR, PRASAD, 1998; PRASAD, 2000; PRASAD, 2007).

Animais deficientes de zinco são suscetíveis a diversos agentes infecciosos, incluindo protozoários tais como *T. cruzi* (FRAKER et al., 1982), *Trypanosoma musculi* (LEE et al., 1983), *Toxoplasma gondii* (TASCI et al., 1995) e *Plasmodium yoelii* (SHANKAR et al., 1995); eucariotos como *Candida albicans* (SINGH et al., 1992) e helmintos como: *Heligmosomoides polygyrus* (SHI et al., 1994), *Strongyloides ratti* (FENWICK et al., 1990b), *Trichinella spiralis* (FENWICK et al., 1990a), *Fasciola hepática* (FLAGSTAD et al., 1972) e *S. mansoni* (NAWAR et al., 1992).

Sabe-se que em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ocorre uma redução dos níveis de zinco, fato este associado ao aumento na incidência de infecções bacterianas por agentes oportunistas (KOCH et al., 1996). Por outro lado, tem-se evidenciado que a suplementação oral de zinco leva a um aumento do número de células CD4⁺ e redução na incidência de tais infecções (ISA et al., 1992; MOCCHEGIANI et al., 1995a), especialmente por *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* (MOCCHEGIANI et al., 1995).

Baixas concentrações *in vivo* de zinco levam a alterações no processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos, interferindo na lise celular mediada por células NK e ação citotóxica das células T (KEEN, GERSHWIN, 1990). Wirth et al. (1989) e Cook-Mills

et al. (1990) observaram que macrófagos de animais deficientes de zinco apresentavam reduzida capacidade de fagocitar *T. cruzi*.

Estudos clínicos têm evidenciado que a administração oral de sulfato de zinco é efetiva no tratamento tanto da leishmaniose cutânea aguda (SHARQUIE et al., 2001), quanto da forma disseminada da doença (SHARQUIE, NAJIM, 2004). Efeitos terapêuticos benéficos deste elemento também foram demonstrados na infecção por *Plasmodium falciparum*, protegendo o hospedeiro contra o parasita (BATES et al., 1993). Lee et al. (1983) demonstraram que animais deficientes de zinco e infectados com *T. musculi* apresentavam três vezes mais parasitas quando comparados aos animais do grupo controle.

In vitro, o composto demonstrou-se ativo contra *Leishmania major* e *L. tropica*, agentes da leishmaniose cutânea (NAJIM et al., 1998). Em modelos murinos, o sulfato de zinco apresentou atividade profilática contra leishmaniose cutânea causada por *L. major* ou *L. tropica*, visto que nos animais oralmente suplementados com sulfato de zinco por 5 dias consecutivos previamente à infecção, nenhuma lesão se desenvolveu (SHARQUIE et al., 2001).

A atividade anti-leishmanial *in vivo* do sulfato de zinco pode resultar da combinação de efeitos diretos e indiretos. O efeito direto pode ser representado pelo dano celular ou pela inibição de enzimas envolvidas no metabolismo do parasita ou virulência (AL-MULLA HUMMADI et al., 2005b), enquanto o mecanismo indireto, apresenta efeito imunomodulador, que resulta em aumento da fagocitose e atividade microbica pelos macrófagos do hospedeiro (AL-MULLA HUMMADI et al., 2005a).

Entretanto, a avaliação da suplementação de micronutrientes durante a infecção chagásica pouco tem sido estudada, razão pela qual este trabalho foi conduzido, apresentando caráter inédito.

1.4 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5- metoxitriptamina), hormônio isolado e descrito pela primeira vez em 1958 por Lerner e colaboradores, é uma indolamina sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano, pela glândula pineal (LERNER et al., 1960).

A cadeia bioquímica de sua síntese inicia-se com a conversão do triptofano, pela ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este, por sua vez, sob a ação da descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD) é transformado em serotonina. Por ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT, também conhecida como serotonina n- acetiltransferase) a molécula de serotonina é acetilada sendo convertida em N-acetilserotonina. Por fim, a N-acetilserotonina tem o grupamento hidroxila transformado em metoxi pela enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT), dando origem à melatonina (figura 2).

Figura 2: Síntese de melatonina, a partir de pinealócitos. Fonte: BAGNARESI et al., 2012.

A produção de melatonina pela glândula pineal é caracterizada por um padrão rítmico diário e sazonal, com baixos níveis plasmáticos durante o dia (1-6 pg/mL) e níveis altos (100-200pg/mL) durante a noite (ZHDANOVA et al., 1997; CLAUSTRAT, CHAZOT, 2005). A variação rítmica da síntese de melatonina é dependente de uma via neural, na qual as informações da luminosidade ambiental recebidas por neurônios da retina são enviadas através de projeções diretas da via retino-hipotalâmica ao núcleo supra-quiasmático hipotalâmico (NSQ) (SPEH, MOORE, 1993). Assim, durante o período noturno, a liberação de noradrenalina nos terminais simpáticos que inervam a glândula pineal, estimula os adrenoreceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, desencadeando uma cascata intracelular de sinalização nos pinealócitos, culminando na ativação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase, a qual é passo-limitante da via de síntese de melatonina, resultando em um aumento da produção desta indolamina (SUGDEN, 1989).

Estudos têm demonstrado que a síntese de melatonina também pode ocorrer em diversas células e tecidos extra pineais, tais como retina, trato gastrointestinal (BUBENIK, KONTUREK, 2011), fígado, rim e baço de roedores e primatas (MENENDEZ-PELAES et al., 1993), placenta humana (LANOIX et al., 2008) e células do sistema imunológico, tais como macrófagos da cavidade peritoneal (MARTINS et al., 2004) e linfócitos humanos (CARRILLO-VICO et al., 2004). Adicionalmente, tal síntese ocorre independente da iluminação ambiental (SIMONNEAUX, RIBELAYGA, 2003), podendo ser classificada como constitucional, como ocorre em células da retina e trato gastrointestinal. Existe ainda a síntese induzida por células imunocompetentes, em decorrência de respostas inflamatórias agudas (MARKUS et al., 2007).

Quando produzida pela pineal, é liberada nos espaços perivasculares da glândula, difundindo-se para a circulação sanguínea, predominantemente ligada à albumina (CARDINALI et al., 1972). De maneira geral, a melatonina circulante tem um tempo de meia vida curto, de aproximadamente 20 minutos, sendo rapidamente metabolizada no tecido hepático. Através das enzimas do citocromo p450, a molécula é hidroxilada e conjugada a

sulfatos ou glucoronídeos, sendo excretada na forma de 6-sulfatoximelatonina (TAN et al., 2007). A análise do metabólito urinário, 6-sulfatoximelatonina, tem-se mostrado uma importante estratégia em estudos clínicos não invasivos, na avaliação dos níveis de melatonina (HIRATA et al., 1974).

A melatonina circulante tem seu perfil plasmático variável de acordo com o desenvolvimento, ou seja, a sua produção e secreção são máximas na infância, alcançando picos ao redor de 3 anos de idade, apresentam um pequeno declínio na puberdade, estabilizam-se na fase de adulto jovem, reduzindo progressivamente em idosos. Tal característica faz com que esta substância possa ser considerada um importante marcador temporal ontogenético, promovendo processos adaptativos desde a infância até a velhice. Diversos trabalhos demonstram que os níveis de melatonina decaem de 20 a 80% com o avançar da idade (REITER, 1995; LIU et al., 1999).

A melatonina é uma molécula anfifílica, ou seja, possui a propriedade de difundir-se com igual capacidade tanto em meios hidrofílicos, quanto lipofílicos (POEGGELER, 2005; CIPOLLA-NETO, AFECHÉ, 2007), podendo atravessar passivamente a membrana celular, e dessa forma, além de atuar sobre os receptores, pode agir e regular alvos intracelulares, independente da interação com tais receptores. Nos mamíferos estão bem caracterizados três subtipos de receptores de membrana, sendo os subtipos de alta afinidade MT1 e MT2, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G (SLOMINSKI et al., 2012). O terceiro subtipo é receptor MT3, o qual posteriormente foi caracterizado como sendo uma enzima da família das quinonas redutases, e cujas ações não estão completamente esclarecidas (NOSJEAN et al., 2000). Sabe-se, no entanto, que a quinona redutase participa na proteção contra o estresse oxidativo, evitando reações de transferência de elétrons de quinonas (FOSTER et al., 2000).

A melatonina também se liga, com menor afinidade, à calmodulina (BENÍTEZ-KING, 2006) e a receptores intracelulares similares aos receptores retinóides (ROR α),

modulando a transcrição de genes envolvidos na resposta imune (GARCÍA-MAURIÑO et al., 2000).

O papel imunomodulatório da melatonina tem sido descrito por diversos autores (CARRILLO-VICO et al., 2004; CARDINALI et al., 2008; SRINIVASAN et al., 2008b; SLOMINSKI et al., 2012). Os efeitos exercidos por esta indolamina nos parâmetros imunes são distintos e dependem de vários fatores tais como dose, via de aplicação, espécie, sexo, idade, assim como estação do ano, ritmo circadiano, homeostasia normal da glândula pineal, condições de estresse, acompanhamento do processo experimental, entre outros (SKWARLO, 2002).

Inicialmente, os estudos sobre sua ação imunomodulatória baseavam-se na retirada da glândula pineal e na observação de diversos parâmetros imunológicos. Desorganização tímica (JANKOVIĆ et al., 1970), depressão na resposta imune humoral e celular (MAESTRONI et al., 1986), além de inibição da síntese de IL-2 e da atividade das células NK em roedores (DEL GOBBO et al., 1989), após a pinealectomia, representam evidências marcantes da ação imunoreguladora exercida pela melatonina (JANKOVIĆ et al., 1993). A presença de receptores específicos para melatonina em neutrófilos (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1993), monócitos (BARJAVEL et al., 1998) e principalmente linfócitos humanos (GUERRERO et al., 1994), reforça a hipótese de que a melatonina poderia participar dos processos inflamatórios como imunomodulador. Isto é especialmente interessante se considerarmos a ação da melatonina em animais senis, resultando em aumento da atividade proliferativa de linfócitos e da taxa de síntese de DNA em linfócitos tímicos e esplênicos (EL-SOKKARY et al., 2003).

Atualmente, as ações da melatonina sobre a proliferação celular e o seu efeito imunomodulador nos mamíferos têm sido alvo de diversas pesquisas (SZE et al., 1993; EL-SOKKARY et al., 2003; CARRILLO-VICO et al., 2005; BAGNARESI et al., 2012). Estudos demonstram o efeito estimulatório, *in vivo* e *in vitro*, da melatonina sobre as células da resposta imune tanto celular quanto humoral (CARRILLO-VICO et al., 2005). Além das

correlações diretas entre a produção de melatonina e variações circadianas e sazonais observadas no sistema imunológico (NELSON, DRAZEN, 2000), estudos pioneiros de Carrillo-Vico e colaboradores (2004) demonstraram que linfócitos ativados podem produzir melatonina e essa produção local está relacionada à modulação da expressão de IL-2. Por outro lado, mediadores da inflamação, tais como TNF- α , atuam diretamente sobre a pineal, modulando a produção de melatonina (FERNANDES et al., 2006; 2009).

Considerando a ampla versatilidade funcional da melatonina, além dos efeitos imunomoduladores, esta indolamina apresenta ações antioxidantes (GALANO et al., 2011), oncostática e antienvhecimento (CARRILLO-VICO et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2008a). Esta última ação parece estar vinculada aos seus efeitos antioxidantes e à alta capacidade em doar elétrons dos carbonos 2 e 3 do anel pirrólico, visto que o estresse oxidativo é uma das principais causas dos danos moleculares que contribuem para o desenvolvimento da degeneração celular e disfunção sistêmica (POEGGLER, 2005). Adicionalmente, entre as ações antioxidantes da melatonina está também a sua capacidade indutora da síntese de enzimas antioxidantes, tais como glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase (LUCHETTI et al., 2010).

A eficácia da melatonina tem sido também estudada em várias doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer (ROSALES-CORRAL et al., 2012) e Parkinson, em que a patogênese está associada ao estresse oxidativo (ESPOSITO, CUZZOCREA, 2010) e à atividade citotóxica de radicais livres, os quais podem causar danos, com consequente perda de funções em proteínas, lipídeos e DNA. Olcese e colaboradores (2009) demonstraram os efeitos benéficos da reposição hormonal de melatonina, tanto em modelos animais, quanto em pacientes com a doença de Alzheimer, reduzindo os déficits cognitivos, bem como diminuindo a expressão de marcadores neurotóxicos.

Outra característica importante da molécula de melatonina é a capacidade de regular o processo de apoptose celular, seja na mobilização de mecanismos reparadores do

DNA, inibindo a apoptose em células imunes e neuronais, e contrariamente atuando como indutor da apoptose em células cancerígenas (LOTUFO et al., 2001; SAINZ et al., 2003).

Devido à sua potente ação indutora do sono, estudos demonstram os efeitos terapêuticos da melatonina nos distúrbios do sono, principalmente nas insônias (MACFARLANE, et al., 1991), nos transtornos ocasionados por mudanças bruscas no fuso horário habitual (HERXHEIMER, WATERHOUSE, 2003; ZAWILSKA et al., 2009) e em trabalhadores com jornada noturna (ZAWILSKA et al., 2009; ROTH, 2012).

Além das diversas ações já citadas, estudos têm demonstrado a ação gastroprotetora da melatonina em ratos com lesões de mucosa, atenuando os efeitos deletérios induzidos pelo estresse (BANDYOPADHYAY et al., 2002). Adicionalmente, sabe-se que em portadores sintomáticos de *Helicobacter pylori* ocorre uma redução dos níveis de melatonina, e esta redução tem sido associada com a patogênese da doença (KLUPIŃSKA et al., 2006).

Um grupo substancial de pesquisadores tem demonstrado o papel regulatório da melatonina sobre as funções de defesa (GUERRERO, REITER, 2002; CARRILLO-VICO et al., 2006; PONTES et al., 2006; BAGNARESI et al., 2012). Estudos inéditos, conduzidos por Santello e colaboradores (2008a) demonstraram a habilidade da melatonina de potencializar a resposta imune do hospedeiro, gerada durante a infecção experimental por *T. cruzi*, resultando em redução da carga parasitária sanguínea e tecidual. Considerando os resultados obtidos em tal estudo, propusemo-nos a estudar os efeitos concomitantes da administração de zinco e melatonina sobre a resposta imunológica durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos imunomodulatórios da administração de zinco e melatonina durante a fase crônica da infecção, em ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, através da avaliação dos seguintes parâmetros:

- Análise fenotípica e determinação da ativação celular através da expressão de marcadores;
- Dosagem de citocinas e da quimicina MCP-1;
- Avaliação da proliferação de esplenócitos, através do ensaio de MTT;
- Avaliação dos níveis de apoptose celular, com o uso de anexina V e iodeto de propídeo;
- Dosagem de óxido nítrico;

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, atualmente, o tratamento dos pacientes chagásicos é realizado por meio da administração do quimioterápico benzonidazol, composto este que demonstra eficácia apenas durante a fase aguda da infecção, levando à cura parasitológica em cerca de 50-70% (RASSI et al., 2000) dos casos. Entretanto, no tratamento de pacientes com infecção crônica, esse fármaco apresenta eficácia terapêutica limitada, entre 6% a 30% (CANÇADO, 2002), sendo a sua indicação restrita aos indivíduos portadores da forma clínica indeterminada recente (GALVÃO et al., 1993). Adicionalmente, o uso do benzonidazol em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias) ocasiona efeitos colaterais indesejáveis (RODRIGUES COURA, DE CASTRO, 2002), podendo resultar na descontinuação do seu uso.

Estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o zinco exerce um importante papel regulatório na imunidade ao *T. cruzi*, durante a fase aguda da doença. A proposta atual consiste em executar um estudo mais detalhado que avalie as ações do zinco quando administrado em associação com uma indolamina de ação pleiotrópica, a melatonina. A ação imunomoduladora da melatonina encontra-se bem estabelecida, no entanto, poucos são os trabalhos que demonstram seu envolvimento na evolução da doença de Chagas.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito imunomodulatório do zinco e da melatonina durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* em ratos Wistar, através da caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T e células Treg, análise da expressão de marcadores celulares, síntese de citocinas, produção de óxido nítrico, proliferação celular e apoptose. Os dados obtidos a partir da avaliação destes parâmetros nos possibilitaram a análise da ativação de diferentes compartimentos da resposta imune, ampliando o estudo fenotípico, bem como o entendimento das subpopulações de linfócitos T e demais células envolvidas na defesa do hospedeiro frente ao parasita.

Os resultados inéditos obtidos neste trabalho demonstraram que o zinco e a melatonina contribuem para modulação da resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção parasitária, controlando a resposta inflamatória exacerbada e conseqüentemente, amenizando as alterações patológicas provocadas pela ação do parasita. Neste sentido, a identificação de substâncias que possam modular a resposta inflamatória pode assumir um papel de grande importância na elaboração de futuras estratégias como alvo de vacinas ou terapias no tratamento de doenças infecciosas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de execução dos experimentos

4.2 Animais utilizados

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Geral da Coordenadoria do Campus de Ribeirão Preto/USP. Esses animais foram ambientados no biotério convencional do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sendo mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com acesso livre a ração e água filtrada *ad libitum*. Três ratos foram mantidos por gaiola para evitar o estresse de superpopulação. Todos os experimentos foram conduzidos com a aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Protocolo número 08.1.835.53.5.

4.3 Grupos Experimentais

Grupo Controle

Controle (C) n = 05

Controle tratado com Zinco (CZ) n = 05

Controle tratado com Melatonina (CM) n = 05

Controle tratado com Zinco e Melatonina (CZM) n = 05

Grupo Infectado pela cepa Y de *T. cruzi*

Infectado (I) n = 05

Infectado tratado com Zinco (IZ) n = 05

Infectado tratado com Melatonina (IM) n = 05

Infectado tratado com Zinco e Melatonina (IZM) n = 05

4.4 Infecção experimental

Os animais dos grupos infectados foram inoculados intraperitonealmente (i.p) com 1×10^5 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*. Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, isolada por SILVA, NUSSENZWEIG (1953), através do xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos Swiss não isogênicos, através de repiques semanais de sangue infectado. A cepa Y possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoces, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA, SCORZA, 1972). Quando inoculada em ratos, o padrão da curva parasitêmica se mantém semelhante aos dos roedores de menor porte, com um pico compreendido entre o 7° e 14° dia da infecção (UYEMURA et al., 1995), dependendo do número de parasitas inoculado, idade e sexo do animal. Após esse período há uma redução da parasitemia.

4.5 Obtenção de antígenos de tripomastigotas de *T. cruzi*

Os antígenos de tripomastigotas utilizados nos ensaios de proliferação celular *in vitro*, foram preparados a partir de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidas de células LLCMK2 (monkey kidney fibroblast cell line). As células foram cultivadas em meio RPMI-C suplementado com 5% de soro bovino fetal em estufa, a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até obter-se uma cultura uniforme e confluenta.

Após 4 a 5 dias, os tripomastigotas foram coletados e centrifugados a 40g a 4°C durante 10 minutos, para a separação das células debris, seguida por outra centrifugação a 700g a 4°C por 10 minutos. O sedimento resultante, contendo os tripomastigotas vivos, foram lavados 5 vezes em PBS gelado (PH 7,2) a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os parasitas ressuspensos em 1,5mL de PBS gelado, sendo submetidos a três ciclos de congelamento-aquecimento a -70°C e 37°C, respectivamente. Em seguida, os parasitas lisados foram submetidos a cinco ciclos de 30 segundos de sonicação (20 KHz, 30 watts). A solução resultante foi centrifugada a 20000

g durante 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, e filtrado em membrana 0,45 µm, sendo o produto da filtração congelado a - 70°C. Após vários processos de obtenção de frações solúveis do parasito, foi realizado um “pool” das diferentes extrações e a quantidade de proteínas dosadas pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão. Alíquotas do antígeno foram congeladas a - 70°C para posterior uso em experimentos (MARCIPAR et al., 2003; MARTIN, TARLETON, 2005).

4.6 Tratamento com zinco

Os animais foram tratados com 0,1 mL de sulfato de zinco (ZnSO₄), diluídos em água, sendo administrados por via oral na dose de 20mg/kg/dia de ZnSO₄ (BRAZÃO et al., 2011), durante os dias de experimento, uma vez ao dia no período da manhã, obedecendo ao mesmo horário de tratamento todos os dias.

4.7 Tratamento com melatonina

Os grupos foram tratados com melatonina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), dissolvida em 0,05 mL de Polietilenoglicol 400 e igual volume de água destilada, sendo administrados por via oral na dose de 05mg/kg/dia (SANTELLO et al., 2008a), durante o período de experimentação, uma vez ao dia, pela manhã, período este em que os níveis plasmáticos de melatonina estão mais baixos, em razão da variação rítmica da síntese desta indolamina.

4.8 Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados no 60º dia após o inóculo infectante, período correspondente à fase crônica da doença.

4.9 Morte dos Animais e Coleta de Sangue

Cada animal foi previamente anestesiado com tribromoetanol 2,5%, na dose de 250mg/Kg/animal, administrado intraperitonealmente e posteriormente morto por decapitação. Após a morte dos animais, foram coletados cerca de 2,0 ml de sangue em tubo plástico sem anticoagulante para a análise imunológica.

4.10 Citometria de fluxo para caracterização fenotípica e funcional de macrófagos e células dendríticas, a partir do lavado peritoneal

Após a eutanásia, os animais foram mantidos em câmara asséptica de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal em suporte de dissecação. A parede abdominal foi exposta, rebatendo-se a pele da região. As células peritoneais foram coletadas por meio de injeção de 5 mL de RPMI, pH 7,2 estéril, gelado, seguido de massagem peritoneal. As células obtidas do lavado peritoneal foram então lavadas por centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C, e a seguir ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640, para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, realizada através da coloração com solução de Azul de Trypan (0,4%).

Após a contagem, a suspensão foi ajustada para 2×10^6 células e as mesmas distribuídas em placas de 96 poços. As suspensões celulares foram incubadas com Fcblock (BD PharMingen), por 20 minutos a 4°C. Ao findar da incubação, as células foram lavadas (1800 rpm por 3 minutos) com PBS (1x) gelado, e o sobrenadante descartado. Em seguida, procedeu-se à marcação das células com anticorpos monoclonais anti-CD11bc- PE-CyTM, anti- macrophage subset- PE, anti-CD80 PE, anti-CD86 FITC, e anti-RT1B-PercP para determinação das sub-populações. Todos os anticorpos foram obtidos da BD Bioscience PharMingen[®], e utilizados na diluição 1/100µL.

Posteriormente, as células foram lavadas com tampão *staining buffer*, e ressuspensas em 100 µL de tampão PBS (1x). Após a transferência para tubos apropriados,

as amostras foram analisadas através de citometria de fluxo em Citômetro BD FACS-Canto (BD Biosciences). A análise dos resultados foi executada usando o programa FACSDiva (BD).

Figura 3: Estratégia de aquisição de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal, de acordo com as características de tamanho e granulosidade (A). Em B, o gráfico em *dot plot* representa a expressão de RT1B em macrófagos peritoneais.

Figura 4: Estratégia de aquisição de células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal, de acordo com as características de tamanho e granulosidade (A). B, gráfico em *dot plot* representativo da expressão de CD11bc em células peritoneais. C e D, histogramas representativos das populações de células dendríticas, subdivididas em relação à expressão de CD86 e CD80, respectivamente.

4.11 Quantificação de Óxido Nítrico

Uma parte (100 µL) da suspensão células peritoneais preparada anteriormente foram distribuídos em placa de 96 poços, contendo 2×10^6 células/ poço, sendo adicionados 100µL de LPS (10 µg/mL) (*E. coli*, sorotipo 026:B6, Sigma, USA) nos poços estimulados.

A placa foi levada à estufa contendo 5% de CO₂, durante 48 horas a 37°C. Após este período, submeteu-se a placa à centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se 100µL do sobrenadante e transferiu-se para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Griess (50 µL de sulfanilamida 1% (Sigma) e 50 µL de N-1-naftiletilenodiamina 0.1% (Sigma) diluídos em solução de ácido fosfórico 5%), permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas, utilizando filtro de 540nm (Referência 0). A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando nitrito de sódio (TERENZI et al., 1995; HRUBY et al., 1997).

4.12 Preparo da suspensão celular

O baço de cada animal foi removido cirurgicamente em condições assépticas, e transportado para uma placa de petri pequena, contendo 5 mL de RPMI 1640. A seguir os baços foram macerados, cuidadosamente para liberação das células, com o auxílio de peneiras para cultura celular (*Cell strainer*- BD Biosciences). Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação a 1800 rpm durante 6 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento de células adicionou-se 2 mL de tampão de hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 1mM, Na₂EDTA 0,1mM), para lise das hemácias, incubando-se por 2 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem, e centrifugação a 1800 rpm por 6 minutos, as células foram ressuspensas em 10mL de RPMI-1640. A suspensão celular obtida permaneceu em repouso por 10 minutos a 4°C para sedimentação de fragmentos tissulares, que a seguir foram removidos. Após homogeneização cuidadosa dos tubos, coletou-se 05 µL desta suspensão, acrescentando em 495 µL de solução de Azul de Trypan (0,4%),

procedendo-se a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Para cada animal foi preparada uma suspensão contendo 2×10^6 células em meio RPMI.

4.13 Análise fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo

A suspensão preparada anteriormente foi utilizada para análise fenotípica dos linfócitos, através da técnica de citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidos contra antígenos de superfície destas células. Alíquotas de 100 μ L da suspensão de células esplênicas (2×10^6 células), foram distribuídos em placa de 96 poços, em fundo U, e incubadas com 100 μ L de Fc-block em tampão de FACS, por 20 min a 4°C. Ao final da incubação, a placa foi centrifugada a 2000 rpm durante 1 minuto e o sobrenadante descartado. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com anti-CD3-APC ou FITC, anti-CD4- PE ou PE-Cy7, anti-CD8-PercP, anti-CD11a-FITC, anti-CD11bc-PE-Cy7, anti-CD25-FITC ou PE, anti-CD28-PE, anti-CD45RA-PE, anti-CD80-PE, anti-CD86-FITC, anti-CD161-FITC, anti-RT1B-PercP, anti-*Macrophage subset*-PE, diluídos em tampão de FACS, incubados por 30 min a 4°C protegidos da luz. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de tampão de FACS e a placa foi centrifugada novamente a 2000 rpm durante 1 minuto. Por último, as células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão de FACS, transferidas para os tubos de leitura. Todos os anticorpos foram obtidos da BD Bioscience PharMingen®, e utilizados na diluição 1/100 μ L.

As suspensões foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo (FACScan-BD/software DIVA-BD) que utiliza os detectores e canais de células adequados para leitura de cada fluorocromo e as análises dos resultados realizadas em software DIVA-BD.

Marcadores celulares analisados:

Descrição	Marcadores Celulares
Marcadores de célula T auxiliar e citotóxica	CD3, CD4, CD8
Marcadores de célula T regulatória	CD4, CD25, Foxp3
Moléculas coestimulatórias	CD28, CD80, CD86
Marcadores de células NK e NKT	CD3, CD161
Marcador de ativação de células T	CD25
Marcador de adesão celular	CD11a
Marcador de macrófago	<i>Macrophage subset</i>

Figura 5: Seleção da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e granulosidade (A). B, gráfico em *dot plot* representativo das populações de células esplênicas, subdivididas em relação à expressão de CD4 e CD8.

Figura 6: Seleção da população celular de acordo com as características de tamanho e granulosidade (A). B, gráfico em *dot plot* representativo das populações de células esplênicas, expressando CD161⁺ (NK) e CD3⁺CD161⁺ (NKT). C, gráfico em *dot plot* representativo da expressão de CD 45RA.

4.14 Caracterização de células T reguladoras através da expressão do fator de transcrição Foxp₃ por citometria de fluxo

Após a obtenção da suspensão contendo 2×10^6 células, alíquotas de 100 μL , foram adicionadas a poços em fundo em U de placas de 96 cavidades. A seguir, foram adicionados a cada poço 100 μL de anticorpos anti-CD16/32 (1/100-Fc-block) diluídos em tampão de FACS (PBS, 2% de SBF e 0,1% de azida), seguindo-se de incubação por 20 minutos a 4°C. Após a lavagem das células com PBS (1x) gelado, e descarte do sobrenadante, procedeu-se a marcação de proteínas de membrana com a adição dos anticorpos monoclonais anti-CD3 FITC, anti-CD4 PECy7, e anti-CD25 PE (obtidos da BD Pharmingen®), incubando-se por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado.

Após a marcação das moléculas externas das células, foi realizada a permeabilização da membrana plasmática com a adição de 200 μL /poço de FOXP3 Fix/Perm buffer (Kit eBioscience, San Diego, CA, EUA), em temperatura ambiente, por 20 minutos, protegido da luz. Após a incubação, as células foram lavadas uma vez com tampão *staining buffer*, e procedeu-se a permeabilização da membrana nuclear com a utilização de 200 μL /poço de solução de *Perm Wash*, seguindo-se nova incubação de 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a centrifugação, e lavagem das células com solução de *Perm Wash*, foi realizada a marcação com o anticorpo para o fator de transcrição Foxp3 (diluído 1/50, em solução de *Perm Wash*-eBioscience, San diego, CA, EUA-) marcado com Alexa Fluor 647, sendo as células incubadas por 30min a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com tampão *staining buffer*, e ressuspensas em 300 μL do mesmo tampão.

Após a transferência para tubos apropriados, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto/Becton , Dickson). A análise dos resultados foi executada usando o programa FACSDiva (BD).

4.15 Ensaio de proliferação celular

Linfoproliferação através de ensaio com MTT:

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem o MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium). Uma parte (100 µL) da suspensão preparada anteriormente foram distribuídos em placa de 96 poços, contendo 2×10^6 células/ poço, sendo adicionados 100µL concanavalina A (ConA: 4 mg/mL) nos poços estimulados. A placa foi levada à estufa contendo 5% de CO₂, durante 48 horas a 37°C. Ao final deste período de incubação, a placa foi retirada e adicionados 50µl de MTT (5 mg/mL diluídos em RPMI incolor). Após 4 horas, foram adicionados 50µl de isopropanol a todos os poços e a placa mantida em temperatura ambiente por 1 hora. A absorvância (A) foi determinada utilizando leitor de microplacas, filtro de 570nm.

4.16 Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo

Marcação com anexina V e iodeto de propídeo

A apoptose é um processo fisiológico que desempenha um papel fundamental no controle de diversos processos vitais, que incluem desenvolvimento embrionário, manutenção da homeostase tecidual, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (BERGANTINI et al., 2005; BRAS et al., 2005).

A exteriorização da molécula de fosfatidilserina na membrana plasmática é um dos eventos iniciais que ocorre durante o processo de apoptose. As células viáveis mantêm os fosfolipídios assimetricamente distribuídos na membrana plasmática, com a molécula de fosfatidilserina voltada para o citoplasma. A anexina V conjugada a fluoresceína (FITC), ao se ligar à fosfatidilserina exposta na superfície celular permite a identificação das células apoptóticas. O iodeto de propídeo, por sua vez, é um corante vital que é incorporado entre

bases nucleicas em células que perderam a integridade da membrana celular, detectando assim células em processo de morte por apoptose tardia (GATTI et al., 1998).

A análise da condição celular (viável ou em processo de apoptose) foi realizada em grupo celular selecionado a partir das seguintes características: (i) tamanho (tamanho e granulose), (ii) integridade da membrana plasmática (coloração por iodeto de propídio, PI) e (iii) redistribuição da fosfatidilserina da membrana plasmática (marcação pela anexina-V conjugada com FITC).

Para a caracterização dos diferentes estágios de apoptose as células esplênicas obtidas foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se às suspensões celulares 100 µL da solução de tampão de ligação da Anexina-V (Annexin Binding Buffer), e 1µL de cada marcador, anexinaV-FITC e de iodeto de propídio (PI) (provenientes da BD Biosciences, EUA). As amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foram adicionados a todos os tubos 400 µL do mesmo tampão, e acondicionados a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo. Paralelamente, foi avaliado o perfil apoptótico dos grupos experimentais, após cultura, durante 4 horas, utilizando como estímulo antígenos de *T. cruzi*. As culturas foram realizadas em placas de 24 poços, e como controle positivo foi utilizado Estaurosporina 1mM (Sigma, EUA). Para avaliação do processo de apoptose, as células em estudo foram submetidas ao mesmo protocolo descrito anteriormente.

As amostras foram analisadas utilizando o equipamento FACSCanto (BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA). A análise dos dados obtidos foi realizada no software FACSDiva (BD), possibilitando a classificação das células em: viáveis (Anexina V-FITC e PI negativa), apoptose inicial (anexina V- FITC positiva e PI negativa) e apoptose avançada (Anexina V- FITC e PI positiva).

Figura 7: Seleção da população células esplênicas, para caracterização dos estágios de apoptose (A). B, gráfico em *dot plot* representativo dos estágios de apoptose. Em C, gráfico em *dot plot* representativo da expressão de anexina V e PI após cultura celular.

4.17 Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , e da quimiocina MCP-1

As células esplênicas recém isoladas, obtidas como descrito no item 4.12, foram ajustadas à concentração de 2×10^6 células. Aliquotas de 100 μ L da suspensão de células esplênicas (2×10^6 células), foram distribuídos em placa de 96 poços, em fundo U. Parte destas células foi estimulada combinação de 5 μ g/mL de forbol miristato acetato (PMA-Sigma) e 1 μ g/mL de ionomicina (Sigma), e a outra parte não recebeu estímulo. As células esplênicas foram incubadas por 4 horas, a 37°C, em atmosfera úmida com tensão constante de CO₂ (5%CO₂). Em seguida, foram adicionados 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma) a todas as cavidades e a placa foi incubada, nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂, por mais duas horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares em função do seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite o acúmulo das citocinas no complexo de Golgi e consequentemente um aumento do sinal, que poderá ser detectado pelo citômetro de fluxo. Após o período total de seis horas de incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, as suspensões de células, tanto estimuladas quanto não estimuladas, foram ressuspensas em PBS 1% de BSA (gelado) e transferidas das cavidades da placa para respectivos tubos cônicos. Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e a seguir, as células ressuspensas em PBS 1% de BSA (gelado). Adicionou-se às suspensões celulares 100 μ L de Fc-block (anti-CD16/32- BD Bioscience) diluídos em tampão de FACS, e as células foram incubadas por 20 min a 4°C. Terminada esta incubação, as células foram lavadas com PBS 1% de BSA, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 1 minuto e o sobrenadante descartado. A seguir, iniciou-se a marcação das moléculas de superfície CD3, CD4 e CD8, visto que a produção de citocinas foi analisada nestas subpopulações de linfócitos. Para isto, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE-Cy7 e

anti-CD8-PercP diluídos em tampão de FACS, incubados por 30 min, a 4°C, protegidos da luz. Em seguida, adicionou-se 500µL de tampão PBS 1% de BSA e os tubos foram centrifugados novamente a 2000 rpm durante 1 minuto, e o sobrenadante descartado. Por último, as células foram ressuspensas em 250 µL de solução CytoFix/CitoPerm (BD Pharmingen), a fim de proporcionar a fixação e permeabilização das células. Após incubação de 20 minutos a 4°C, e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com tampão PermWash (BD Pharmingen). O sobrenadante foi aspirado, e as células ressuspendidas em tampão Perm Wash, contendo os anticorpos monoclonais citocina-específicos, todos conjugados com PE.

Seguiu-se nova incubação a 4°C, e ao abrigo da luz, por um período de 30 minutos. Após a centrifugação, e lavagem das células com tampão PermWash (BD Pharmingen), submeteu-se os tubos à centrifugação a 2000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi aspirado, e a todos os tubos foram adicionados PBS 1% de formol.

Após a transferência para tubos apropriados, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto/Becton , Dickson). A análise dos resultados foi executada usando o programa FACSDiva (BD). Todos os anticorpos monoclonais foram obtidos da BD Bioscience PharMingen.

4.18 Dosagens de IL-2

Para a dosagem de IL-2, foi utilizado o kit da empresa IBL-America (Immuno-Biological Laboratories), seguindo-se as especificações do fabricante. Foram utilizadas placas de 96 poços já sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocinas pra ratos.

Foram preparadas as amostras, utilizando-se soro de rato diluído 1:4 (125 µL de soro + 375 µL de reagente diluente), e os tubos da curva, através da reconstituição do padrão de IL-2 (8000 pg/mL). Para a realização da curva padrão, pipetou-se 125 µL de reagente diluente em seis tubos de ensaio. No tubo 1, adicionou-se 125 µL do padrão

diluído inicialmente, e procedeu-se uma série de diluições 1:1 até o tubo 6, sendo adicionado no tubo 7 apenas o reagente diluente (0 pg/mL).

Foram adicionados 50 µL das amostras experimentais nos demais poços (em duplicata). Em seguida, adicionaram-se às placas 100 µL do anticorpo biotinilado anti-IL-2, e as mesmas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas quatro vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem (25 vezes concentrado, diluído 1:25 em água destilada).

A revelação enzimática foi feita pela adição de 100µL/poço de estreptavidina-peroxidase (HPR) diluída em tampão de diluição (120 µL de HPR diluído em 12 mL tampão de diluição), e as placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Após novo ciclo de quatro lavagens, foi adicionado substrato cromógeno 100 µL/poço, incubando novamente por 30 minutos, protegendo da luz e parando a reação com a adição de 100µL de solução de parada (H_3PO_4 1M). As densidades ópticas (D.O) das placas foram lidas em leitor de microplacas (Teccan, Modelo Sunrise- µQuant) em um comprimento de onda de 450nm.

4.19 Análise estatística

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism versão 5.0. A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância: One-Way ANOVA e post test de Bonferroni Considerando estatisticamente significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do percentual de macrófagos e expressão de RT1B

A análise do percentual de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal, foi determinada através da técnica de citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para estas células (*macrophage subset* BD Bioscience Pharmigen®). Adicionalmente, avaliamos a ativação de macrófagos, através da análise de receptores de macrófagos (RT1B-MHC Classe II).

Nos grupos controles (sem infecção), apenas os animais submetidos ao tratamento com melatonina apresentaram redução no percentual de macrófagos (figura 8). No 60º dia após a infecção, o tratamento dos animais com zinco, melatonina ou simultaneamente zinco e melatonina provocou redução do número de macrófagos quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (figura 8).

Com relação à expressão da molécula RT1B em macrófagos, não observamos alterações significativas entre os grupos de animais submetidos à terapia com zinco e/ou melatonina. Este perfil foi observado tanto nos animais infectados, como nos animais não infectados (figura 9). É interessante notar, no entanto, que no 60º dia após a infecção os animais infectados apresentaram um aumento na expressão de RT1B em macrófagos quando comparado aos animais não infectados, sem tratamento.

Figura 8: Avaliação do percentual de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Figura 9: Quantificação de macrófagos, expressando o marcador RT1B (MHC Classe II), obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.2 Quantificação de Óxido Nítrico

Nos animais sem infecção e tratados melatonina, zinco ou terapia conjunta de zinco e melatonina não houve alteração significativa na produção de óxido nítrico por células estimuladas ou não com LPS, em relação aos animais do grupo controle não tratados.

Nas células não estimuladas com LPS, no 60º dia após a infecção, os grupos tratados com zinco, melatonina ou associação das duas substâncias apresentaram uma redução na produção de NO quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.

Nas células estimuladas com LPS, a terapia dos animais com melatonina ou simultaneamente melatonina e zinco provocou redução na produção de óxido nítrico durante a fase crônica da infecção, quando comparado aos animais do grupo infectado sem tratamento. No entanto, não houve diferença significativa entre os animais infectados tratados com zinco e aqueles não suplementados.

Figura 10: Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.3 Avaliação do percentual de células dendríticas e expressão de CD80 e CD86

Os resultados obtidos após 60 dias de infecção por *T. cruzi* demonstram que os animais submetidos à terapia com melatonina ou associação de zinco e melatonina apresentaram uma redução nas porcentagens de células dendríticas (figura 11). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os animais dos grupos controles.

A análise da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) em células dendríticas foi realizada através da marcação realizada em citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais para as moléculas CD80 e CD86. Ao avaliarmos o percentual de células dendríticas que expressavam CD86 (figura 12b), observamos uma redução significativa destas células nos animais infectados e submetidos ao tratamento com zinco, melatonina ou terapia conjunta das duas substâncias, quando comparado aos animais infectados e não tratados. Não houve diferença significativa na expressão de CD86, entre os animais do grupo controle, submetidos ou não à terapia com zinco e/ou melatonina.

Com relação à expressão da molécula co-estimulatória CD80 (figura 12a), não observamos alterações significativas entre os grupos controle e infectados, submetidos ou não à terapia.

Figura 11: Avaliação do percentual de células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Figura 12: Análise da expressão das moléculas CD80 (A) e CD86 (B) em células dendríticas, obtidas a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.4 Avaliação do percentual de células NK (CD161⁺) e NKT (CD3⁺CD161⁺) no baço

Durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*, observamos um significativo aumento no percentual de células NK (figura 13a) e NKT (figura 13b) nos animais infectados e não tratados, quando comparado aos animais do grupo controle, submetidos ou não à terapia com zinco e/ou melatonina.

Observou-se uma diminuição significativa da expressão da molécula CD161, nos animais infectados e tratados com zinco, melatonina ou associação das duas substâncias quando comparado aos animais do grupo infectado sem tratamento (figura 13a).

A administração de zinco, melatonina ou associação de melatonina e zinco nos animais infectados não resultou em alterações significativas no percentual de células NKT, quando comparado aos animais do grupo infectado sem tratamento.

Figura 13: Avaliação do percentual de células NK (A) e NKT (B), no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.5 Avaliação do percentual de linfócitos B (CD45RA⁺)

As porcentagens de linfócitos B foram determinadas através da marcação realizada em citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais para a molécula CD45RA. Como podemos observar na figura 14, a análise dos dados não mostrou diferença significativa na expressão de CD45RA entre animais tratados e não tratados. Este perfil foi observado tanto nos animais infectados, como nos animais não infectados (figura 14).

Figura 14: Avaliação do percentual de linfócitos B (CD45RA⁺) em células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

5.6 Análise fenotípica das populações celulares do baço por citometria de fluxo

5.6.1 Análise das sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

A figura 15 apresenta uma análise comparativa das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ (figura 15a) e TCD8⁺ (figura 15b). Como podemos observar na figura 15a, na fase crônica da infecção por *T. cruzi* o percentual de células TCD4⁺ estava significativamente maior nos animais infectados sem tratamento, quando comparado aos animais do grupo controle (não infectados) e não tratados.

O tratamento dos animais infectados por *T. cruzi* com zinco, resultou em uma diminuição do percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺, quando comparados aos animais infectados e não tratados.

Por outro lado, os animais tratados com zinco, melatonina ou associação de zinco e melatonina apresentaram significante redução no percentual de células TCD8⁺ quando comparado aos animais infectados, e não tratados (figura 15b).

É interessante notar, que os animais do grupo controle submetidos à terapia conjunta de zinco e melatonina, apresentaram uma redução no percentual de células TCD8⁺ quando comparado aos animais do grupo controle, não tratados.

Figura 15: Análise das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (A) e T CD3⁺CD8⁺ (B) no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.6.2 Análise da expressão de CD11a e CD28 nas sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

A fim de avaliarmos o efeito do tratamento dos animais com zinco e/ou melatonina, analisamos a expressão de marcadores característicos de ativação celular, durante a infecção crônica por *T. cruzi*.

Como podemos observar na figura 16a, a infecção por si provocou um aumento na expressão da molécula CD11a em linfócitos TCD4⁺ quando comparado ao grupo controle sem infecção, demonstrando potencial capacidade migratória destas células. A administração concomitante de zinco e melatonina nos animais do grupo controle resultou em redução na expressão de CD11a no compartimento de células TCD8⁺, quando comparado aos animais do grupo controle sem tratamento.

Nos grupos infectados, não observamos diferenças na expressão de CD11a nos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de animais submetidos ou não ao tratamento com zinco e/ou melatonina (figura 16a e b).

Figura 16: Avaliação do percentual de linfócitos TCD4⁺CD11⁺ (A) e TCD8⁺CD11⁺ (B) em células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Com relação à expressão de CD28, (figura 17), podemos observar que as maiores alterações foram detectadas nos animais tratados com zinco, os quais apresentaram aumento na expressão de CD28, tanto em linfócitos CD4⁺ (figura 17a), quanto em células TCD8⁺ (figura 17b). Resultados semelhantes foram observados nos animais do grupo controle, submetidos à terapia com este oligoelemento.

Figura 17: Avaliação do percentual de linfócitos TCD4⁺CD28⁺ (A) e TCD8⁺CD28⁺ (B) em células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.7 Caracterização de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)

Com o objetivo de avaliar a participação das células T reguladoras durante a infecção experimental por *T. cruzi*, as porcentagens de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, foram determinadas no baço de ratos Wistar, através da técnica de citometria de fluxo.

Como demonstrado na figura 18a, a população de células CD4⁺CD25⁺ aumentou tanto nos animais do grupo infectado sem tratamento, quanto naqueles submetidos à terapia com melatonina, ou associação de zinco e melatonina, quando comparado aos animais do grupo controle, submetidos ou não ao tratamento. No entanto, observamos uma redução no percentual dos linfócitos T CD4⁺CD25⁺ nos animais tratados com zinco, quando comparados aos animais do grupo infectado sem tratamento. Da mesma forma, a subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD25^{high} (figura 18b) reduziu nos animais infectados tratados com zinco, em relação aos animais infectados e não tratados. Por outro lado, o tratamento isolado com melatonina ocasionou um aumento no percentual de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}, quando comparado aos animais do grupo infectado, não submetidos à terapia com zinco e/ou melatonina.

A expressão da molécula CD25 na superfície de células T não é suficiente para determinar o perfil fenotípico das células Treg, uma vez que esta molécula está presente também em células ativadas (BAECHER-ALLAN et al., 2001). Portanto, para determinarmos se o aumento na população de linfócitos TCD4⁺CD25⁺, foi decorrente do aumento na população de células Treg, e não da ativação de linfócitos T *naïve*, verificamos a expressão de Foxp3, fator de transcrição característico de células Treg nos linfócitos T CD4⁺CD25^{high}.

A análise dos dados mostrou que apenas a terapia concomitante de zinco e melatonina ocasionou um aumento significativo no percentual de células T reguladoras (figura 19) em relação aos animais do grupo infectado sem tratamento. Na avaliação entre os grupos controle observamos que o tratamento dos animais com zinco ou associação de

zinco e melatonina resultou em aumento no percentual de células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$, quando comparado aos animais do grupo controle e não tratados.

Figura 18: Avaliação do percentual de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ (A) e $CD4^+CD25^{high}$ (B) no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Figura 19: Avaliação do percentual de células CD4⁺CD25^{high} e do fator de transcrição Fxp3 no baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.8 Proliferação de esplenócitos

Nos grupos Controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas quanto à proliferação celular.

Nos grupos infectados, durante a fase crônica da infecção, a terapia concomitante de melatonina e zinco provocou aumento na proliferação de esplenócitos, estimulados com ConA, no 60º dia após a infecção, quando comparado aos animais do grupo infectado sem tratamento.

Nos grupos infectados, e sem estímulo de ConA, não foram observadas alterações significativas na resposta proliferativa.

Figura 20: Avaliação da proliferação de esplenócitos, estimulados ou não com ConA (4µg/mL), de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.9 Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo

Estudos demonstram que a apoptose está entre os mecanismos imunoreguladores envolvidos na imunopatogênese durante a infecção por *T. cruzi*. Dessa forma, determinamos o processo de morte celular por apoptose, utilizando marcadores capazes de identificar possíveis alterações na membrana plasmática, tais como Anexina V e Iodeto de propídeo (PI). Assim, avaliamos por citometria de fluxo, o percentual de células esplênicas, positivas apenas para Anexina V (estágio recente do processo de apoptose) e positivas para Anexina V e PI (estágio tardio de apoptose), em animais infectados por *T. cruzi* e animais do grupo controle, submetidos ou não ao tratamento com zinco e/ou melatonina (figura 21).

Nos grupos controles (sem infecção), observamos uma redução significativa no percentual de células em estágio de apoptose inicial e tardio nos animais tratados com melatonina, ou simultaneamente com zinco e melatonina (figura 21 a e b), comparados às células do grupo controle não submetido ao tratamento.

A análise dos dados demonstrou que em animais infectados, a administração de zinco, melatonina ou terapia conjunta resultou em redução no percentual de células em apoptose inicial (figura 21a), em relação ao grupo de animais infectados, sem tratamento. Adicionalmente, observamos também uma redução no percentual de células em processo de apoptose tardio (figura 21b), nos animais tratados com zinco ou melatonina, quando comparado ao grupo infectado, e não tratado.

A partir da utilização dos marcadores Anexina V e PI, também foi possível identificar células viáveis, ou seja, Anexina V/FITC e PI negativas. Em nossos experimentos, observamos um aumento no percentual de células viáveis nos animais controles submetidos à terapia com melatonina, ou terapia conjunta de melatonina e zinco. Entre os animais infectados, o maior percentual de células viáveis foi observado entre os animais infectados e tratados com melatonina ou zinco.

Figura 21: Marcação de células esplênicas de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, com anexina V e iodeto de propídeo. As células foram marcadas com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose (A) e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose (B). Em C, células anexina V-FITC⁻PI⁻. Grupos experimentais: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Paralelamente, avaliamos o perfil apoptótico dos grupos experimentais, após cultura, durante 4 horas, utilizando como estímulo antígenos de *T. cruzi*.

Sem estímulo: Observamos que as células esplênicas, dos animais não infectados e tratados com melatonina e melatonina associada a zinco, apresentaram redução no percentual de células em apoptose inicial e tardia, em relação às células dos animais do grupo controle sem tratamento. Entre os animais infectados e tratados com zinco, melatonina ou terapia conjunta das duas substâncias, observamos uma diminuição significativa no percentual de apoptose tardia, quando comparados aos animais infectados e não tratados.

Com extrato parasitário: As células esplênicas dos grupos controles tratados com melatonina ou associação de zinco e melatonina e estimuladas com extrato parasitário apresentaram uma redução significativa no percentual de apoptose tanto inicial quanto tardia. Entre os animais infectados, apenas a terapia concomitante com zinco e melatonina ocasionou uma diminuição significativa no percentual de apoptose recente em células esplênicas quando comparados às células de animais infectados e não tratados.

Na avaliação das células que estão em um estágio tardio de apoptose (Anexina V/FITC e PI positivas), observamos que o tratamento dos animais com zinco, melatonina ou terapia conjunta com zinco e melatonina resultou em redução no percentual de apoptose, em relação aos animais infectados e não tratados.

Cultura celular

Figura 22: Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/ml), com anexina V e iodeto de propídeo em ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As células foram marcadas com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose (A e B) e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose (C e D). Grupos experimentais: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM), Estaurosporina (controle positivo). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

A administração de zinco, ou associação de zinco e melatonina resultou em aumento no percentual de células viáveis, entre os animais dos grupos controle tratados, quando comparados aos animais não infectados e não tratados. Apenas as células esplênicas, não estimuladas de animais infectados tratados com zinco apresentaram um aumento no percentual de células viáveis, quando comparados aos animais do grupo infectado e não tratado.

Figura 23: Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/ml), com anexina V e iodeto de propídeo em ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, (A e B) células viáveis, anexina VFITC-PI⁺. Grupos experimentais: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, p < 0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.10 Detecção intracelular das citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α

Os resultados descritos abaixo referem-se à produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α , obtidas a partir de linfócitos esplênicos dos animais infectados por *T. cruzi* e dos animais não infectados (controles), ambos estimulados *in vitro* com PMA e ionomicina.

A análise das células TCD4⁺ produtoras de IL-4 revelou que os animais dos grupos controles tratados com zinco, apresentaram um aumento na produção de IL-4. É interessante notar que o mesmo perfil, com aumento na produção de IL-4 foi observado entre os animais infectados e tratados com zinco.

A avaliação do percentual de células TCD4⁺IL-10⁺ mostrou um aumento do percentual destas células nos animais dos grupos controles tratados com zinco, quando comparado aos animais não infectados e sem tratamento. Entre os animais infectados, o tratamento concomitante de zinco e melatonina resultou em aumento no percentual de células TCD4⁺IL-10⁺ quando comparado ao grupo infectado, não submetido à terapia.

Durante a infecção com *T. cruzi* observamos uma diminuição na produção de IFN- γ , por células TCD4⁺ nos animais infectados e tratados com zinco, quando comparado aos animais infectados e não tratados.

A análise dos dados demonstra uma redução significativa na produção de TNF- α , nos animais dos grupos controles tratados com melatonina, ou associação de zinco e melatonina. No entanto, as quantidades de TNF- α produzidas pelas células TCD4⁺ não sofreram alterações nos animais submetidos à terapia com zinco e/ou melatonina.

Figura 24: Análise da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção. As citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo, nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

O tratamento dos animais infectados com zinco ocasionou um aumento no percentual de células TCD8⁺ produtoras de IL-4. Um aumento na produção de IL-10 por células TCD8⁺ também foi observado entre os animais dos grupos controles tratados com zinco, quando comparados aos animais controles não submetidos à terapia. É interessante notar que o tratamento concomitante dos animais com zinco e melatonina, resultou em aumento na produção de IL-10, em relação aos animais infectados e não tratados.

A avaliação dos linfócitos TCD4⁺IFN- γ ⁺ mostrou uma redução no percentual destas células, nos animais dos grupos controles tratados com zinco, quando comparados aos animais não infectados e sem tratamento. Entre os animais infectados, não observamos alterações significativas na produção IFN- γ .

Os grupos tratados com zinco e/ou melatonina não apresentaram alterações significativas na produção de TNF- α pelas células TCD8⁺, em relação aos animais dos grupos não submetidos à terapia. Este perfil foi observado tanto nos animais infectados, como nos animais não infectados.

Figura 25: Análise da produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção. As citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF/ α foram detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo, nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.11 Produção de MCP-1 por células do baço

Como demonstrado na figura 26, a produção da quimiocina MCP-1 reduziu nos animais submetidos à terapia com zinco, melatonina, ou associação das duas substâncias. É interessante notar, que este perfil foi observado tanto nos animais infectados por *T. cruzi*, como nos animais não infectados.

Figura 26: Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD4⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção. A quimiocina MCP-1 foi detectada e quantificada intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo, nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

O tratamento dos animais controles com zinco ou associação de zinco e melatonina ocasionou uma redução no percentual de linfócitos TCD8⁺ produtores de MCP-1. Uma redução na produção desta quimiocina também foi observada entre os animais dos grupos infectados, e tratados com zinco, melatonina ou simultaneamente zinco e melatonina quando comparados aos animais infectados, não submetidos à terapia.

Figura 27: Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD8⁺ esplênicos de ratos Wistar machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção. A quimiocina MCP-1 foi detectada e quantificada intracelularmente através da metodologia de citometria de fluxo, nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.12 Dosagem de IL-2

Nos grupos controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas na produção de IL-2. No 60º após o inoculo, apenas o grupo submetido à administração simultânea de zinco e melatonina apresentou níveis elevados de IL-2 quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.

Figura 28: Concentrações de IL-2 (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 60º dia após a infecção nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com zinco (CZ), controle tratado com melatonina (CM), controle tratado com zinco e melatonina (CZM), Infectado (I), Infectado tratado com zinco (IZ), Infectado tratado com melatonina (IM), Infectado tratado com zinco e melatonina (IZM). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

6 DISCUSSÃO

A importância do zinco como elemento essencial para as funções imune inata e adaptativa tanto em humanos como em outros animais já está bem estabelecida (PRASAD, 1996; SHANKAR, PRASAD, 1998; PRASAD, 2007; RINK, HAASE, 2007; KNOELL, LIU, 2010).

Trabalhos recentes demonstraram que este oligoelemento participa da modulação da resposta imune do hospedeiro, auxiliando no controle de distintas infecções, como as causadas por bactérias, vírus e parasitas (PUERTOLLANO et al., 2011; CHASAPIS et al., 2012). Experimentos de FRAKER et al. (1982) evidenciaram a vulnerabilidade de camundongos deficientes de zinco a alguns patógenos, incluindo *T. cruzi*, com consequente morte dos animais por deficiência da resposta imunológica.

A melatonina é um hormônio sintetizado e secretado primariamente pela glândula pineal, e está envolvido em um amplo espectro de processos biológicos. Além da ação imuno-estimulatória em roedores (HALDAR, AHMAD, 2010), esta indolamina apresenta diversas outras funções tais como oncostática e antioxidante, entre outras (MEDIIVILLA et al., 2010; BEJARANO et al., 2011; GALANO et al., 2011).

A elucidação do papel da melatonina como importante fator na modulação do sistema imune tem sido alvo de diversas pesquisas (CARRILLO-VICO et al., 2004; SLOMINSKI et al., 2012). Estudos demonstraram que este hormônio exerce efeitos diretos e indiretos sobre o sistema imune (MAESTRONI, 1993; SKWARLO-SOŃTA, 1996, SANTELLO, 2007, SANTELLO 2008a, SANTELLO 2008b). A melatonina parece interferir na atividade do zinco, com ação dependente do hormônio timulina. Tal fato foi comprovado através de experimentos, nos quais a remoção da glândula pineal causou uma significativa diminuição dos níveis séricos de zinco, bem como das concentrações plasmáticas de IL-2, alterações estas que foram revertidas mediante a suplementação com melatonina (DEL GOBBO, 1989; MOCCHEGIANI et al., 1999).

Em razão da importância do zinco e da melatonina para a manutenção da homeostasia do sistema imune, o objetivo desta pesquisa, foi realizar a caracterização fenotípica de linfócitos T, e células T reguladoras, bem como definir o perfil dos parâmetros imunológicos durante a fase crônica da doença de Chagas experimental.

Os mecanismos envolvidos na evolução da infecção natural ou experimental por *T. cruzi*, bem como o desenvolvimento de diferentes formas clínicas e graus de severidade da doença de Chagas ainda são pouco compreendidos. Acredita-se que estas manifestações estejam relacionadas à complexa relação parasito/hospedeiro, sendo consequência da ação de múltiplos fatores, tais como: presença de *T. cruzi* (variabilidade das cepas, virulência, antigenicidade, tropismo e inóculo), forma de contágio (HOFT, ECKIHOFF, 2002), fatores ambientais e exposição a outros patógenos (VAGO 2000). Como fatores associados ao hospedeiro, temos o dimorfismo sexual (PRADO JÚNIOR et al., 1998), variabilidade intra-espécie (ANDRADE et al., 1985) perfil da resposta imune (FERREIRA, BORGES, 2002) e idade (CARDILLO et al., 1993).

As interações iniciais são cruciais para geração de uma resposta imunológica eficiente direcionando o subsequente desenvolvimento de populações de células T efectoras e reguladoras, cruciais para o controle da carga parasitária. Neste contexto, componentes clássicos da imunidade inata, tais como células dendríticas, macrófagos, e células NK são fundamentais para o estabelecimento da imunidade protetora durante os eventos iniciais da infecção por *T. cruzi*.

Macrófagos são células importantes na regulação da resposta imune frente a *T. cruzi* (TALIAFERRO, PIZZI, 1995; SAVINO et al., 2007), limitando a replicação do parasito (VESPA et al., 1994), através da produção de citocinas pró-inflamatórias e componentes microbicidas, durante a fase aguda da doença de Chagas (PADILLA et al., 2007; DOS REIS et al., 2005; COSTA et al., 2006).

Durante a fase aguda, já foi demonstrada a predominância de macrófagos e linfócitos T nos infiltrados inflamatórios cardíacos, os quais podem estar relacionados

diretamente ao processo de fibrose, com destruição das fibras cardíacas e ativação de fibrogênese (REIS et al., 1997; CUNHA NETO et al., 1998). Neste contexto, o trabalho apresentado por Da Silveira et al. (2007) demonstrou o envolvimento destas células com a fibrose, observada no cólon de pacientes chagásicos. Os macrófagos secretam fatores que estimulam especificamente a proliferação de fibroblastos *in vitro* (LEIBOVICH, ROSS, 1976) e aumentam a síntese de colágeno extracelular (HEPPLESTON, STYLES, 1967).

Estes e outros achados sugerem a participação de macrófagos nos processos inflamatórios persistentes, favorecendo o desenvolvimento das lesões observadas na fase crônica, tais como a cardiomiopatia, que pode ser acompanhada de arritmias ou morte súbita. Nossos estudos demonstraram que durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* os animais submetidos à terapia com zinco, melatonina ou associação de melatonina e zinco apresentavam redução no número de macrófagos peritoneais, quando comparado aos animais infectados e não tratados, evidenciando uma ação protetora destas substâncias.

Outros estudos demonstraram que a exposição das células a estímulos inflamatórios, tais como componentes derivados de patógenos, como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), aumenta a expressão das moléculas MHC II (GUERMONPREZ et al., 2002). Por outro lado, na ausência de sinais inflamatórios ou infecção, as células apresentadoras de antígenos expressam número reduzido dessas moléculas. Resultados semelhantes foram observados em nossos experimentos, visto que os animais infectados por *T. cruzi* e não tratados apresentaram um aumento no percentual de macrófagos expressando RT1B (MHC II) quando comparados aos animais não infectados e sem tratamento. No entanto, o tratamento dos animais com zinco e/ou melatonina não resultou em alterações significativas na expressão de RT1B em macrófagos, quando comparado aos animais infectados e não tratados.

O estímulo para a ativação de macrófagos é proveniente do reconhecimento de antígenos através de receptores do tipo *Toll* (TLRs), e de moléculas secretadas por outras células da imunidade inata, tais como as células NK. Macrófagos ativados secretam IL-12,

que ativa as células NK a produzirem IFN- γ (ALIBERTI et al., 1996), e este por sua vez, é capaz de ativar a expressão da enzima iNOS, aumentando a produção de óxido nítrico, o qual, inibe a replicação intracelular do parasito (GAZZINELLI, et al., 1992; REED, 1995). Outra citocina relevante, a IL-10, é capaz de inibir a ativação de macrófagos induzida por IFN- γ , inibindo tanto a liberação de NO quanto a diferenciação de células Th1 (SILVA et al., 1992).

Apesar de possuir papel fundamental no controle da infecção por *T. cruzi*, o NO também pode estar envolvido no comprometimento tecidual observado na doença de Chagas. A ativação da enzima iNOS e a produção exacerbada de NO e de outros potentes oxidantes, como o peroxinitrito, estão diretamente associados ao surgimento de desordens neurodegenerativas (BÖ et al., 1994; SMITH et al., 1997). A diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico, acompanhada de um processo inflamatório local, são as principais características evidenciadas nas manifestações digestivas da Doença de Chagas, como o megaesôfago e o megacólon (KÖBERLE, 1968; TAFURI, 1971).

Estudos de Garcia et al. (1999) avaliaram a relação do NO com a destruição neuronal durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Através da utilização de inibidores da enzima NOS (N-nitro-L-arginina-metil-éster), os autores demonstraram que a denervação do plexo mioentérico do cólon é menor nestes animais, nos quais a produção de NO está comprometida.

Trabalhos indicam que a melatonina age reduzindo a expressão da enzima iNOS, e consequentemente, limitando a produção de NO (GILAD et al., 1998; MAURIZ et al., 2012). A influência do zinco sobre a produção de NO também foi descrita em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (BRAZÃO et al., 2009), os quais indicaram que a administração deste oligoelemento causou uma redução na produção de NO por macrófagos peritoneais, durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*. Os resultados observados em nosso estudo corroboram com os dados citados anteriormente, pois os animais infectados e submetidos à

terapia com zinco, melatonina ou ambos simultaneamente, apresentaram uma redução nos níveis de NO quando comparados aos animais infectados sem tratamento.

Estudos de Reis et al. (1993) e Higuchi et al. (1993) demonstraram que o infiltrado inflamatório no miocárdio, em pacientes portadores da forma crônica cardíaca, é composto principalmente por células T CD8⁺, macrófagos e células NK. Um aumento precoce e significativo da atividade destas células tem sido reportado em animais infectados por *T. cruzi* (HATCHER, KUHN, 1982; CARDILLO et al., 1996). Nossos resultados fortalecem essas evidências, visto que a infecção provocou um aumento no percentual de células NK (CD161) e NKT quando comparado ao grupo controle sem infecção.

Outras pesquisas agregam informações, demonstrando que a ativação persistente de células do sistema imunológico, como células NK, e outras células pró-inflamatórias pode resultar em um processo inflamatório crônico, com consequente dano tecidual (SATHLER-AVELAR et al., 2009). A análise das porcentagens de células NK demonstrou uma redução destas células nos animais infectados e tratados com zinco, melatonina ou com ambos, quando comparado aos animais infectados e não tratados.

À medida que a infecção por *T. cruzi* progride, respostas imunes específicas de padrão linfomonocitário são ativadas (D'IMPÉRIO et al., 1985; MINOPRIO et al., 1989), com atuação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), linfócitos B que secretam anticorpos e a expansão de clones de células T citotóxicas (CD8⁺). As células T CD4⁺ reconhecem os peptídeos antigênicos ligados às moléculas de MHC de classe II na membrana das células apresentadoras de antígenos, sendo fundamentais na orquestração da imunidade celular contra patógenos intracelulares como *T. cruzi*. Tem sido demonstrado que em modelos de infecção chagásica experimental, tais células também desempenham papel essencial direcionando e potencializando mecanismos efetores, como ativação de fagócitos, de linfócitos citotóxicos TCD8⁺ e produção de citocinas (TARLETON, 1991).

No entanto, a participação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ na geração da cardiomiopatia também tem sido analisada, em razão da predominância destas células no

infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos (BILATE, CUNHA-NETO, 2008), sendo estas responsáveis pelo estabelecimento das lesões cardíacas, uma das principais manifestações associadas à morbidade e mortalidade da doença. Corroborando com estes resultados, Higuchi et al. (1993), utilizando técnicas de imunohistoquímica estabeleceram uma correlação direta entre a intensidade de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com miocardite chagásica e os níveis de antígenos de *T. cruzi*. Adicionalmente, Tostes Júnior e colaboradores (1994) observaram a presença de células TCD8⁺ em biópsias de coração de pacientes chagásicos crônicos, sugerindo que estas estariam envolvidas nas lesões cardíacas. Diante de tais estudos, observamos em nossos experimentos, que os animais tratados com zinco, melatonina ou associação de zinco e melatonina apresentaram significativa redução no percentual de células TCD8⁺ quando comparado aos animais infectados, e não tratados. No compartimento de linfócitos TCD4⁺, o tratamento dos animais com zinco resultou em redução no percentual destas células, quando comparado ao grupo infectado, não submetido à terapia.

Embora os mecanismos envolvidos na patogênese da cardiopatia chagásica ainda não estejam completamente esclarecidos, estudos sugerem a interferência do processo de apoptose na modulação da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi*, contribuindo para a persistência do parasita na fase crônica da doença de Chagas. Neste contexto, estudos de Tostes et al. (2005) demonstraram que a apoptose de cardiomiócitos e células inflamatórias no tecido cardíaco de pacientes chagásicos, está associada com a progressão da falência cardíaca observada nestes pacientes. Estudos semelhantes, conduzidos por Rodrigues et al. (2008) revelaram que os níveis de apoptose em células estimuladas com antígenos de *T. cruzi* foram significativamente maiores nos pacientes com falência cardíaca, quando comparados a pacientes apresentando a forma clínica indeterminada da doença.

Diversos estudos (JIANG et al., 1995; UMEZAWA et al., 1999; SEVE et al. 2002) evidenciaram que a quelação de zinco induzia o processo de morte celular por apoptose.

Por outro lado, a adição deste elemento no meio protegeria as células da apoptose. Foi demonstrado que o zinco tem a capacidade de manter tal efeito protetor mesmo se adicionado após curtos períodos depois de agentes indutores de apoptose, tais como TNF- α e radiação γ (ZALEWSKI, FORBES, 1993). Sabe-se que a depleção de zinco pode ativar membros de uma família de proteases, denominadas caspases, culminando no início da apoptose (BEYERSMANN, 2002). A capacidade da melatonina de mobilizar mecanismos reparadores do DNA, inibindo a apoptose em células imunes e neuronais também tem sido evidenciada (SAINZ et al., 2003). Nossos experimentos condizem com estes, visto que o tratamento com zinco e /ou melatonina foi efetivo na redução do percentual de apoptose (estágio recente ou tardio), em células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário.

A importância da molécula CD28, para a ativação celular, tem sido descrita em diversas patologias (MATHUR et al., 1999; VILLEGAS et al., 1999; ELIAS et al., 2005). CD28 desempenha um importante papel na diferenciação de células B e produção de anticorpos, além de auxiliar no recrutamento de células para sítios de inflamação através da indução da produção de quimiocinas (BOUR-JORDAN, BLUESTON, 2002). A interação de CD28 com seus ligantes (CD80 e CD86), expressos em células apresentadoras de antígenos (como células dendríticas e macrófagos) é essencial para a completa ativação de células T (YANG, WILSON, 1996).

Sabe-se que a molécula de CD28 é requerida também para a expansão de células T reguladoras (LIU et al., 2006). Outros pesquisadores já relataram que camundongos CD28^{-/-} apresentavam acentuada redução no número de Células Treg CD4⁺CD25⁺ (SALOMON et al., 2000; TANG et al., 2003). Em elegante trabalho, Miyahira et al. (2003), demonstraram a importância da molécula CD28 na resistência à infecção por *T. cruzi*. De acordo com os autores, animais deficientes da molécula CD28 apresentaram maior suscetibilidade à infecção por este parasita, como evidenciado pelos altos índices de parasitemia e mortalidade. Estudos de Martins et al (2004) confirmaram a importância do co-

receptor CD28, no estabelecimento de respostas específicas contra *T. cruzi*, ao verificar que os animais CD28^{-/-} desenvolviam alta parasitemia sanguínea e tecidual.

Adicionalmente, outra interessante pesquisa observou que pacientes chagásicos com complicações graves, decorrentes da forma digestiva, apresentavam uma redução na porcentagem de células CD4⁺CD28⁺, o que poderia sugerir uma falha nos mecanismos de resistência imunológica e de alguma forma contribuir para a progressão da doença (LE MOS et al., 1998). Em nossos experimentos, apenas o tratamento isolado dos animais infectados com zinco, resultou em aumento no percentual de células TCD4⁺CD28⁺ quando comparado aos animais infectados e não tratados.

Alguns estudos envolvendo modelos murinos ou seres humanos demonstraram que a ativação de células T está entre os mecanismos imunológicos associados ao desenvolvimento de doenças como diabetes mellitus e lúpus eritematoso sistêmico (FINCK et al., 1994; LENSCHOW et al., 1995). Por outro lado, os pesquisadores demonstraram os benefícios do bloqueio das moléculas de CD80 e CD86, impedindo a ativação de linfócitos T *naive*, pelas células apresentadoras de antígenos. LENSCHOW e colaboradores (1995) observaram que a terapia combinada de anticorpos monoclonais anti-CD80 e anti-CD86, é capaz de retardar a infiltração de linfócitos TCD4⁺, em modelo de enxerto pancreático, reduzindo as probabilidades de rejeição. Em estudo recente, Gomes et al. (2012) sugeriram que pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas apresentavam reduzida expressão das moléculas MHC-II e CD86. Esses achados poderiam explicar a baixa ativação de linfócitos observada nestes pacientes assintomáticos e soropositivos para *T. cruzi*. Nossos resultados corroboram indiretamente com os achados acima, ao revelarem menor expressão de CD86 em células dendríticas, nos animais infectados e submetidos à terapia de zinco, melatonina ou associação das duas substâncias, quando comparados aos animais do grupo infectado sem tratamento. Por outro lado, o percentual de células dendríticas que expressavam a molécula CD80 foi semelhante para todos os grupos de animais.

Outra abordagem que consideramos pertinente para o estudo dos mecanismos imunológicos operantes durante a infecção por *T. cruzi* é a caracterização das células T reguladoras (Treg). Estudos sugerem o envolvimento de células T reguladoras na resposta imune durante infecções causadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários (MILLS, 2004). A ação das células Treg pode traduzir-se em efeitos deletérios ou protetores ao hospedeiro, visto que a atividade supressora dessas células pode limitar respostas imunes efetoras desreguladas, ou exacerbadas, prevenindo o desenvolvimento de danos teciduais. Por outro lado, a capacidade imunossupressora destas células pode propiciar a persistência do patógeno (MILLS, 2004).

Estudos recentes conduzidos por De Araújo e colaboradores (2012) ressaltaram a alta expressão de Foxp3 em células TCD4⁺CD25⁺ de pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de Chagas. Neste contexto, estudos de DA SILVEIRA et al. (2009) também evidenciaram a maior expressão de Foxp3 em pacientes chagásicos que não apresentavam complicações digestivas quando comparado a pacientes com mega cólon.

Adicionalmente, estudos de Vitelli-Avelar et al. (2005) relataram a importância das subpopulações de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ nos mecanismos imunorregulatórios durante a infecção por *T. cruzi*. Os autores demonstraram um aumento na frequência de células CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ e NKT (CD3⁺CD16⁻CD56⁺), em pacientes portadores da forma clínica indeterminada. Tais autores sugeriram que a ausência falta de populações regulatórias em indivíduos sintomáticos poderia levar à exacerbação das atividades citotóxicas, culminando em dano tecidual, observado em pacientes com forma clínica cardíaca da doença de Chagas. Nossos experimentos concordam indiretamente com esses, visto que nos animais infectados e suplementados com zinco e melatonina houve um aumento na expressão de células CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ quando comparado aos animais infectados e não tratados.

É importante ressaltar, que a molécula CD25 é também expressa por células ativadas tais como linfócitos T, células B e macrófagos/monócitos (KNAPP et al., 1989). De modo interessante, observamos uma redução na expressão da molécula CD25 em linfócitos

TCD4⁺ nos animais infectados e submetidos à terapia com zinco. Adicionalmente o percentual de células TCD4⁺CD25^{High} também foi menor nestes animais quando comparado aos animais infectados e não tratados. Por outro lado, os animais infectados e tratados com melatonina apresentaram um aumento no percentual de linfócitos TCD4⁺CD25^{High}.

Alguns autores têm relatado a importância da IL-2 para a função de células T reguladoras, visto que em camundongos, a deficiência desta interleucina ocasiona uma redução das Treg (PAPIERNIK et al., 1998; ALMEIDA et al., 2002; MALEK et al., 2002). Estudos sugerem a ação estimulatória da melatonina sobre a produção de IL-2 por linfócitos T auxiliares humanos (GARCIA-MAURIÑO, et al, 1997; SRINIVASAN et al., 2011). Por outro lado, tais citocinas podem modular a síntese de melatonina ao nível da glândula pineal (CUTANDO, SILVESTRE, 1995; LISSONI, 1999). Desta forma, não é surpreendente que a melatonina tenha sido descrita como sinérgica com a IL-2 no tratamento de portadores de câncer (LISSONI et al., 1994,1995). Os estudos sobre os efeitos imunológicos do zinco evidenciaram que a deficiência deste elemento em humanos resulta em várias anormalidades na resposta imune, com diminuição na produção de IL-2, parâmetro este que retorna aos níveis normais após suplementação com zinco (PRASAD, 1998, 2007). Corroborando com estes estudos previamente citados, demonstramos em nossos experimentos que a terapia dos animais com zinco e melatonina resulta em aumento significativo na produção de IL-2 quando comparado aos animais infectados, não submetidos ao tratamento (BRAZÃO et al., 2011)

Similar às células T reguladoras, as células NKT têm sido descritas como uma subpopulação de grande relevância em respostas alérgicas (JIN, 2009), inflamatórias (MURDOCH, 2007), antitumorais (KENNA, 2003; MOLLING et al., 2005) autoimunes (CROWE et al., 2003) e imunoregulatórias (GODFREY et al., 2000; KRONENBERG, GAPIN, 2002; HANSEN, SCHOFIELD, 2004), além de participarem da regulação da resposta imune dirigida contra diversos patógenos como vírus, bactérias e parasitas

(HANSEN , SCHOFIELD, 2004). Adicionalmente, DUTHIE, KAHN (2005) demonstraram a importância das células NKT na imunidade anti-*T. cruzi*, conferindo proteção ao hospedeiro.

Estudos fenotípicos demonstram que células NKT compreendem uma subpopulação de linfócitos T, distintos das células T convencionais e células NK, expressando receptores de ambos os tipos celulares, como o receptor de células T (TCR) e o NK1.1 (CD161 em ratos). Estudos de Vitelli-Avelar e colaboradores (2005) revelaram que a presença dessas células contribui para a prevenção do dano tecidual induzido pela infecção. No entanto, em nossos estudos, a administração de zinco e/ou melatonina durante a infecção experimental por *T. cruzi*, não resultou em alterações significativas no percentual de células NKT.

A importância dos linfócitos B, no mecanismo de resistência à infecção por *T. cruzi*, foi mostrada no trabalho de Cardillo e colaboradores (2007), que ao infectarem animais geneticamente deficientes de células B constataram que estes animais apresentavam maior susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*, com diminuição do infiltrado inflamatório e redução do número de linfócitos T de memória. Estudos de PASCUTTI et al. (2003) também demonstraram que a resistência de ratos adultos à infecção aguda por *T. cruzi* ocorre em razão da adequada produção de anticorpos. Em nosso trabalho, a caracterização das subpopulações de células B durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* foi realizada através da marcação da molécula (CD45RA), no entanto, não foram observadas alterações na porcentagem de linfócitos B nos animais controle e infectados, submetidos ou não à terapia com zinco e melatonina.

Recentemente, De Araújo et al. (2012) mostraram que pacientes portadores da forma clínica cardíaca da Doença de Chagas apresentavam maior frequência de células Treg expressando IL-6⁺, IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ e CTLA-4⁺ quando comparados a pacientes assintomáticos, ou seja, com a forma clínica indeterminada da doença. De forma semelhante, outros estudos evidenciaram a produção de altos níveis de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico de pacientes crônicos sintomáticos, com redução nos

níveis de IL-10, quando comparado a pacientes apresentando a forma indeterminada da doença (GOMES et al., 2003, 2005). Comprovando o fundamental papel desta citocina durante a infecção por *T. cruzi*, estudos evidenciaram uma correlação entre a progressão da cardiopatia chagásica crônica e a produção de altos níveis de IFN- γ em seres humanos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999). Diferentemente do que ocorre na infecção aguda por *T. cruzi* trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa evidenciaram redução nos níveis de IFN- γ em animais suplementados com zinco, contribuindo para a prevenção de danos teciduais observados na fase crônica da doença. Com base no exposto acima, é interessante o fato de que em nossos estudos a administração de zinco ocasionou uma redução na expressão de IFN- γ em linfócitos TCD4⁺. Adicionalmente, uma redução na expressão desta citocina, em células TCD8⁺, foi observada nos animais dos grupos controles, tratados com este oligoelemento.

Progressivamente acumularam-se as evidências de que IL-10 é capaz de regular negativamente a resposta inflamatória durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* (HUNTER et al., 1997), evitando consequentemente o dano tecidual. De Araújo e colaboradores (2012) observaram que monócitos obtidos de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada da doença, possuíam baixa expressão da molécula MHC (HLA em humanos), e alta expressão de IL-10 quando comparados aos pacientes com a forma clínica cardíaca da doença. Em contrapartida, a produção de TNF- α em quantidades elevadas tem sido encontrada em pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (SOUZA et al., 2004; DE ARAÚJO et al., 2012), o que pode causar uma resposta inflamatória exacerbada e, consequentemente resultar em lesões teciduais. Em nossos estudos, a análise das células TCD4⁺ e TCD8⁺ demonstrou que os níveis de expressão de IL-10 estavam aumentados nos animais infectados tratados com zinco e melatonina quando comparados aos animais infectados e não tratados. Por outro lado, a produção de TNF- α foi menor nos animais controles e tratados com melatonina, ou associação de zinco e

melatonina. Entre os animais infectados por *T. cruzi* não observamos alterações significativas na produção desta interleucina.

A IL-4 é outra interleucina que apresenta papel fundamental para o controle do processo inflamatório no tecido cardíaco, durante a fase crônica da infecção (SOARES et al., 2001). Talvani e colaboradores (2000) observaram que em animais resistentes à infecção por *T. cruzi*, a produção de citocinas padrão Th1 é importante durante os estágios iniciais da doença. Por outro lado, nestes animais resistentes, ocorre um desvio da resposta para um padrão Th2 em estágios tardios da infecção. Adicionalmente, estudos conduzidos por Soares et al. (2001) revelaram que a ausência de IL-4, em camundongos *Knockout* resulta em um processo inflamatório exacerbado no miocárdio, constituído predominantemente por células mononucleares. Ainda, de acordo com os referidos autores, a IL-4 é capaz de regular a produção de IFN- γ , contribuindo na prevenção do dano tecidual, observado no coração de animais infectados por *T. cruzi*. Em nossos estudos o tratamento dos animais com zinco resultou em aumento na expressão de IL-4 em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺.

Durante a fase aguda da Doença de Chagas observa-se uma imunossupressão com redução nas respostas linfoproliferativas para antígenos do parasito (PINGE-FILHO et al., 1999). Segundo Abrahamsohn e Coffman (1995) e Brazão et al. (2008), as células infectadas por *T. cruzi* perdem progressivamente sua capacidade de resposta linfoproliferativa frente a antígenos do parasita. Por outro lado, diversos estudos tem evidenciado os efeitos da melatonina exógena na linfoproliferação (PERSENGIEV, KYURKCHIEV, 1993), ativação (VIJAYALAXMI et al., 1996), migração (LOTUFO, et al., 2001), e produção de citocinas por linfócitos humanos (DI STEFANO, PAULESU, 1994; GARCIA-MAURIÑO et al., 1997). Em situações de pinealectomia, ou naquelas de inibição da produção de melatonina, verifica-se um estado de imunossupressão, que desaparece quando os pacientes são tratados com este hormônio.

Estudos enfatizaram os efeitos da melatonina administrada por via oral em ratos, resultando no aumento da atividade proliferativa de linfócitos e da taxa de síntese de DNA em linfócitos tímicos e esplênicos (EL-SOKKARY et al., 2003). Trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório observou que após tratamento com zinco, os animais infectados com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, apresentavam aumento da resposta proliferativa de esplenócitos (BRAZÃO et al., 2008b). Nossas pesquisas são complementares a estes dados, pois nos animais infectados submetidos à terapia de zinco e melatonina foi detectado um aumento da proliferação de esplenócitos quando comparados aos animais sem tratamento.

Sabe-se que a adesão seguida pela internalização de *T. cruzi* são etapas que dependem da interação entre as moléculas de superfície do protozoário com a célula-alvo. A ativação de TLRs, através do reconhecimento de padrões moleculares conservados nos tripanossomos, leva à produção de inúmeras moléculas de adesão e substâncias quimiotáticas, que irão controlar o afluxo e a ativação de células inflamatórias ao local da infecção, determinando a composição do infiltrado celular. Estudos conduzidos por Reis et al. (1993), demonstraram que a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, miocárdicas e linfóides observadas nas lesões, contribui para a patogênese da doença de Chagas. No presente estudo, observamos uma redução na expressão de CD11a (LFA-1, CD11a/CD18) em linfócitos TCD8⁺ nos animais dos grupos controles tratados com melatonina, ou associação de zinco e melatonina, em relação aos animais controles, não tratados. Entre os infectados, não observamos alterações significativas na expressão de CD11a quando comparados aos grupos infectados e não tratados.

A migração de células ao tecido inflamado é um passo fundamental na resposta inflamatória e envolve o rolamento destas células, adesão firme ao endotélio, migração transendotelial e seu deslocamento para o tecido, em resposta a gradientes de quimiocinas. No entanto, o recrutamento excessivo de leucócitos, devido à expressão de quimiocinas, pode estar implicado na patogênese de diversas doenças inflamatórias agudas e crônicas

(PROUDFOOT, 2002) como, por exemplo, asma (WALSH, 2006), esclerose múltipla (TSUNODA et al., 2004) artrite reumatóide (DAWSON et al., 2003), e doenças inflamatórias intestinais (MACDERMOTT, 1999).

Inúmeros aspectos envolvidos na imunopatogênese da doença de Chagas ainda não foram totalmente esclarecidos. No entanto, o estudo das quimiocinas nos últimos anos tem contribuído para o entendimento do seu papel no estabelecimento e manutenção da miocardite induzida pela infecção por *T. cruzi* (AUKRUST et al., 1998; 2001, DOS SANTOS et al., 2001). Teixeira et al. (2002) avaliaram a prevalência de quimiocinas indutíveis por IFN- γ , como MCP-1/CCL-2, em lesões cardíacas de camundongos com 120 dias de infecção por *T. cruzi*. Resultados similares foram obtidos em outro trabalho (AUKRUST et al., 1998) utilizando monócitos do sangue periférico de pacientes com falência cardíaca congestiva, os quais produziam altos níveis das quimiocinas MCP-1 e MIP- α , indicando uma correlação positiva entre os níveis de quimicinas e a gravidade das lesões cardíacas, bem como o grau de disfunção do ventrículo esquerdo em pacientes chagásicos crônicos. É interessante ressaltar, que em nosso modelo experimental, níveis reduzidos de MCP-1 em células TCD4⁺ e TCD8⁺ foram observados nos grupos submetidos à terapia de zinco, melatonina, ou ambos simultaneamente.

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a melatonina e o zinco exercem uma ação moduladora sobre diversos parâmetros da resposta imune, amenizando as consequências patológicas provocadas pela ação do parasita ao hospedeiro, durante a fase crônica da doença de Chagas experimental. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que possam modular a resposta inflamatória, contribuindo para prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença, são alvos importantes no tratamento da doença de Chagas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o zinco e a melatonina contribuem para modulação da resposta imunológica, controlando a resposta inflamatória exacerbada e conseqüentemente, amenizando as alterações patológicas provocadas pela ação do parasita.

A terapia com zinco e melatonina durante a fase crônica da infecção experimental resultou em modificações importantes na resposta imunológica, como evidenciado pelo aumento no percentual de células T reguladoras, da proliferação celular, dos níveis de IL-2, IL-4 e IL-10, com redução das taxas de apoptose celular, das concentrações de óxido nítrico, IFN- γ e MCP-1. Em conjunto, nossos dados corroboram com a hipótese de que uma acentuada ativação celular, na ausência de mecanismos imunomoduladores, pode resultar em danos teciduais.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 1996; 84:231-244.

Akamine M, Higa F, Haranaga S, Tateyama M, Mori N, Heuner K, Fujita J. Interferon-gamma reverses the evasion of Birc1e/Naip5 gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin. *Microbiol Immunol*. 2007; 51:279-287.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124:783-801.

Al-Mulla Hummadi YM, Najim RA, Al-Bashir, NM. The mechanism behind the antileishmanial effect of zinc sulphate. I. An *in-vitro* study. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005a; 99:27-36.

Al-Mulla Hummadi YM, Al-Bashir NM, Najim RA. The mechanism behind the antileishmanial effect of zinc sulphate. II. Effects on the enzymes of the parasites. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005b; 99:131-139.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live tripomastigotes. *Infect Immun*. 1996; 64:1961-1967.

Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol*. 2002; 169:4850-4860.

Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM. Caracterização morfológica e histológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gazeta médica da Bahia*. 1970; 70:32-42.

Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res*. 1985; 18:499-506.

Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007; 12:2797-2806.

Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1998; 97:1136-1143.

Aukrust P, Damås JK, Gullestad L, Frøland SS. Chemokines in myocardial failure-pathogenic importance and potential therapeutic targets. *Clin Exp Immunol*. 2001; 124: 343-345.

Bagnaresi P, Nakabashi M, Thomas AP, Reiter RJ, Garcia CR. The role of melatonin in parasite biology. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 181:1-6.

Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, Pereira ME, Coffman RL, Dias JC, Cancado JR, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R: IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 127-131.

Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. *Indian J Exp Biol*. 2002; 40:693-705.

Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol*. 1998; 160:1191-1197.

Bates CJ, Evans PH, Dardenne M, Prentice A, Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Hoare S, Cole TJ, Horan SJ; Longman SC. A trial of zinc supplementation in young rural Gambian children. *Br J Nutr*. 1993; 69:243-255.

Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 108:14-20.

Benítez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*. 2006; 40:1-9.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FoxP₃. *Nat Genet*. 2001; 27:20-21.

- Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte A C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2005; 27: 120-125.
- Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. Mat Wiss U Werkstofftech. 2002; 33:764-769.
- Bilate AM, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2008; 50:67-74.
- Bittencourt AL. Transmissão vertical. In: Andrade Z, Brener Z, Barra M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.p.16-19.
- Bö L, Dawson TM, Wesselingh S, Mörk S, Choi S, Kong PA, Hanley D, Trapp BD. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. Ann Neurol. 1994; 36:778-786.
- Borges MM, Mello DA, Teixeira ML. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with *Trypanosoma cruzi*. Rev Saúde Pública. 1982; 16:233-242.
- Borges MM, De Andrade SG, Pilatti CG, Do Prado Júnior JC, Kloetzel JK. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87:493-502.
- Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. J Clin Immunol. 2002; 22:1-7.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochemistry (Mosc). 2005; 70:231-239.
- Brazão V, Del Vecchio Filipin M, Caetano LC, Toldo MP, Caetano LN, Do Prado JC JR. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc supplementation during experimental infection. Exp Parasitol. 2008a; 118:549-554.
- Brazão V, Caetano LC, Del Vecchio Filipin M, Paula Alonso Toldo M, Caetano LN, do Prado JC Jr. Zinc supplementation increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. Vet Parasitol. 2008b; 154: 32-37.
- Brazão V, Caetano LC, Filipin Mdel V, Santello FH, Toldo MP, do Prado JC Jr. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc supplementation in the immune response during the course of experimental disease. Exp Parasitol. 2009; 121:105-109.

- Brazão V, Del Vecchio Filipin M, Santello FH, Caetano LC, Abrahão AA, Toldo MP, do Prado JC Jr. Melatonin and zinc treatment: distinctive modulation of cytokine production in chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Cytokine*. 2011; 56:627-632.
- Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1963; 5:220-224.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997; 114:103-110.
- Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.55-56.
- Bubenik GA, Konturek SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol*. 2011; 62:13-9.
- Bustamante JM, Novarese M, Rivarola HW, Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Paglini-Oliva PA. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. *Parasitol Res*. 2007; 100:1407-1410.
- Caetano L, Zucoloto S, Kawasse LM, Toldo MPA, Prado Júnior JC. Influence of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in the depletion of esophageal neurons in *Calomys callosus*. *Dig Dis Sci*. 2006; 51:1796-1800.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. 2001; 167:416-423.
- Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002; 44: 29-37.
- Cardillo F, Falcão RP, Rossi MA, Mengel J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol*. 1993; 23:2597-2605.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*. 1996; 64:128-134.

Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, 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. 2007; 122:584-595.

Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. Endocrinology. 1972; 91:1213-1218.

Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. Neuroimmunomodulation. 2008; 15:272-278.

Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. Congenital parasitic infections: a review. Acta Trop. 2012; 121:55-70.

Carrillo-vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. FASEB J. 2004; 18:537-539.

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, Guerrero JM. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90:992-1000.

Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. Curr Opin Investig Drugs. 2006; 7:423-431.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chagas disease after organ transplantation - Los Angeles, California, 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006; 55:798-800.

Chagas, C. Nova Tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida para o homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1:159-218.

Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. Arch Toxicol. 2012; 86: 521-534.

Chieffi PP, Amato Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: CLB Balieiro Editores; 2000.

- Cipolla Neto J, Afeche SC. Glândula pineal. In: Aires MM. 3a ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p.805.
- Claustrat BBJ, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005; 9:11-24.
- Cook-Mills JM, Wirth JJ, Fraker PJ. Possible roles for zinc in destruction of *Trypanosoma cruzi* by toxic oxygen metabolites produced by mononuclear phagocytes. *Adv Exp Med Biol.* 1990; 262:111-121.
- Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MO, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LM: The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 253-255.
- Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006; 177:3193-3200.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010; 465:S6-S7.
- Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJ, Hayakawa Y, Sidobre S, Keating R, Kronenberg M, Smyth MJ, Godfrey DI. Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol.* 2003; 171:4020-4027.
- Cunha Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, Bacal F, Carrara D, Ianni B, Mady C, Kalil J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31:133-137.
- Cutando A, Silvestre FJ. Melatonin: implications at the oral level. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1995; 8:81-86.
- D'Império Lima MR, Joscowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. Very large and isotipically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 1985; 15:201-203.
- Da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology.* 2007; 134: 789-796.

Da Silveira AB, de Araújo FF, Freitas MA, Gomes JA, Chaves AT, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, da Cunha Souza G, Bernardino Júnior R, Fujiwara R, d'Avila Reis D, Correa-Oliveira R. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol*. 2009; 70:65-67.

Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J, Bach JF. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79:5370-5373.

Dardenne M. Zinc and immune function. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56:20-23.

Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2003; 7: 35-48.

De Araújo FF, Da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Fujiwara RT, Silva Gomes JA. Characterization of the presence of Foxp3⁽⁺⁾ T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum Pathol*. 2011; 42:299-301.

De Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA. Foxp3(+)CD25(high) CD4(+) regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*. 2012; 217:768–777.

Del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calio R, Nistico G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol*. 1989; 11:567-573.

Di Stefano A, Paulesu L. Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J Pineal Res*. 1994; 17:164-169.

Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia. In: Dias JCP, Coura JR. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: Editora Fundação Oswaldo Cruz; 1997. p.33-65.

Dias JC, Amato Neto V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44:68-72.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001; 193:1303-1310.

Dos Reis GA, Freire-De-Lima CG, Nunes MP, Lopes MF. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *Trends Parasitol*. 2005; 21:237-243.

Dos Santos PV, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Prevalence of CD8(+) alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^(Low)LFA-1^(High)VLA-4^(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect*. 2001; 3: 971-984.

Dost CK, Saraiva J, Zentgraf U, Monesi N, Engels W, Albuquerque S. Is nitric oxide involved in the tolerance of *Calomys callosus* as a reservoir host towards *Trypanosoma cruzi* infection? *J Infect*. 2006; 52:49-55.

Duthie MS, Kahn SJ. NK cell activation and protection occur independently of natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol*. 2005; 17: 607-613.

El-Sokkary GH, Reiter RJ, Abdel-Ghaffar SKh. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thymic lymphocytes of old rats. *Neuro Endocrinol Lett*. 2003; 24: 215-223.

Elias RM, Sardinha LR, Bastos KR, Zago CA, da Silva AP, Alvarez JM, Lima MR. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. *J Immunol*. 2005; 174:790-799.

Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol*. 2010; 8:228-242.

Favier A, Favier M. Effects of zinc deficiency in pregnancy on the mother and the newborn infant. *Rev Fr Gynecol Obstet*. 1990; 85:13-27.

Felonato M, Pina A, Bernardino S, Loures FV, de Araujo EF, Calich VL. CD28 exerts protective and detrimental effects in a pulmonary model of paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 2010; 78:4922-4935.

Fenwick PK, Aggett PJ, Macdonald D, Huber C, Wakelin D. Zinc deficiency and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Trichinella spiralis*. Am J Clin Nutr. 1990a; 52:166-172.

Fenwick PK, Aggett PJ, Macdonald DC, Huber C, Wakelin D. Zinc deprivation and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Strongyloides ratti*. Am J Clin Nutr. 1990b; 52:173-177.

Fernandes PA, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. J Pineal Res. 2006; 41:344-350.

Fernandes PA, Bothorel B, Clesse D, Monteiro AW, Calgari C, Raison S, Simonneaux V, Markus RP. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production *in vivo*. J Neuroendocrinol. 2009; 21:90-97.

Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 443-457.

Ferreira I De L, Silva TP. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39:507-509.

Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. Science. 1994;265:1225-1227.

Flagstad T, Andersen S, Nielsen K. The course of experimental *Fasciola hepatica* infection in calves with a deficient cellular immunity. Res Vet Sci. 1972; 13:468-475.

Flora Filho R, Zilberstein B. Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and functions. Rev Assoc Med Bras. 2000; 46:265-271.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. FoxP₃ programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003; 4:330-336.

Food and Agriculture Organization and World Health Organization (2002). Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok: FAO AND WHO.

Foster CE, Blanchet MA, Talalay P, Faig M, Amzel LM. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. Free Radic Biol Med. 2000; 29:241-245.

- Fraker PJ, 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. 1982; 112:1224-1229.
- Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. J Nutr. 2000; 130:1399-1406.
- Frieke C. Function and Mechanism of zinc. J Nutr. 2000; 130:1437-1446.
- Fukamach Y, Karasaki Y, Sugiura T, Itoh H, Abe T, Yamamura K, Higashi K. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 246:364-369.
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. J Pineal Res. 2011; 51:1-16.
- Galvão LM, Nunes RM, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 220-223.
- Galvão LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. J Clin Microbiol. 2003; 41:5066-5070.
- Garcia SB, Paula JS, Giovannetti GS, Zenha F, Ramalho EM, Zucoloto S, Silva JS, Cunha FQ. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol. 1999; 93:191-197.
- Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-De-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:1521-1528.
- Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafil-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. J Immunol. 1997; 159:574-581.

Garcia-Mauriño S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res.* 2000;29:129-37.

Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:895-900.

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007; 445:771-775.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 1992; 22:2501-2506.

Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF-kappaB activation. *FASEB J.* 1998; 12: 685-693.

Gless U, Schmitt Y, Ziegler S, Kruse-Jarres JD. Chromatographic separation of serum proteins and estimation of their zinc and copper content. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1992; 6:245-250.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 2000; 21: 573-583.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003; 71:1185-1193.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun.* 2005;73:7960-7966.

Gomes JA, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar D, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Silvestre KF, Batista MA, Schachnik NC, Correa-Oliveira R, Eloi-Santos S, Martins-Filho OA. Impaired phagocytic capacity driven

by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology*. 2012. doi.org/10.1016/j.imbio.2012.01.014.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67.

Guerrero JM, Lopez-Gonzalez MA, Osuna C, Calvo JR. Specific binding of melatonin by immunocompetent cells in humans and rodents. Modifications during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 719:369-377.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem*. 2002; 2:167-179.

Haase H, Mocchegiani E, Rink L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology*. 2006; 7:421-428.

Hadden JW. Thymic endocrinology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 840:352-358.

Haldar C, Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *J Photochem Photobiol B*. 2010; 98:107-117.

Hansen DS, Schofield L. Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int. J. Parasitol*. 2004; 34:15-25

Hatcher FM, Kuhn RE. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by Natural killer cells. *Science*. 1982; 218:295-296.

Heppleston AG, Styles JA. Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. *Nature*. 1967; 214:521-522.

Herxheimer A, Waterhouse J. The prevention and treatment of jet lag. *BMJ*. 2003; 326:296-297.

Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;423:157-160.

Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. J Biol Chem. 1974; 249:1311-1313.

Hoft DF, Eckihoff CS. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. Infect Immun. 2002; 70:6715-6725.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003; 299:1057-1061.

Hruby K, Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Nobilis M. Potential cancerostatic benfluron is metabolized by peroxidase: *in vitro* biotransformation of benfluron by horseradish peroxidase. Gen Physiol Biophys. 1997; 16: 321-327.

Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1997; 158:3311-3316.

Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. J Nutr. 2003; 133:1452-1456.

Isa L, Lucchini A, Lodi S, Giachetti M. Blood zinc status and zinc treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. Int J Clin Lab Res. 1992; 22:45-47.

Ishido M, Suzuki T, Adachi T, Kunimoto M. Zinc stimulates DNA synthesis during its antiapoptotic action independently with increments of an antiapoptotic protein, Bcl-2, in porcine kidney LLC-PK(1) cells. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 290:923-928.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002; 20:197-216.

Janković BD, Isaković K, Petrović S. Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. Immunology. 1970; 18:1-6.

Janković BD, Jovanova-Nesić K, Nikolić V, Nikolić P. Brain-applied magnetic fields and immune response: role of the pineal gland. Int J Neurosci. 1993; 70:127-134.

Jiang S, Chow SC, McCabe MJ JR, Orrenius S. Lack of Ca²⁺ involvement in thymocyte apoptosis induced by chelation of intracellular Zn²⁺. Lab Invest. 1995; 73:111-117.

Jin N, Roark CL, Miyahara N, Taube C, Aydinug MK, Wands JM, Huang Y, Hahn YS, Gelfand EW, O'Brien RL, Born WK. Allergic airway hyperresponsiveness-enhancing

gammadelta T cells develop in normal untreated mice and fail to produce IL-4/13, unlike Th2 and NKT cells. *J Immunol.* 2009;182:2002-2010.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11:373-384.

Keen CL, Gershwin ME. Zinc deficiency and immune function. *Annu Rev Nutr.* 1990; 10:415-431.

Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol.* 2003; 171:1775-1779. Erratum in: *J Immunol.* 2003; 171:5631

Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:337-342.

Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100:567-575.

Klupińska G, Chojnacki C, Harasiuk A, Stepień A, Wichan P, Stec-Michalska K, Chojnacki J. Nocturnal secretion of melatonin in subjects with asymptomatic and symptomatic *Helicobacter pylori* infection. *Pol Merkur Lekarski.* 2006; 21:239-242.

Knapp W, Dorken B, Rieber P, Schmidt RE, Stein H, Von Dem Borne AE. CD antigens 1989. *Blood.* 1989; 74: 1448-1450.

Knoell DL, Liu MJ. Impact of zinc metabolism on innate immune function in the setting of sepsis. *Int J Vitamin Nutr Res.* 2010; 80:271-277.

Köberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968, 6: 63-116

Koch J, Neal EA, Schlott MJ, Garcia-Shelton YL, Chan MF, Weaver KE, Cello JP. Zinc levels and infections in hospitalized patients with AIDS. *Nutrition.* 1996; 12:515-518.

Kronenberg, M. and Gapin, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2:557-568.

Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J, Vaillancourt C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res.* 2008; 45:50-60.

Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci.* 2002; 17:251-255.

Lee CM, Humphrey PA, Aboko-Cole GF. Interaction of nutrition and infection: effect of zinc deficiency on immunoglobulin levels in *Trypanosoma musculi* infection. *J Natl Med Assoc.* 1983; 75:677-682.

Leibovich SJ, Ross R. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts *in vitro*. *Am J Pathol.* 1976; 84:501-514.

Lemos EM, Reis D, Adad SJ, Silva GC, Crema E, Correa-Oliveira R. Decreased CD4⁽⁺⁾ circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal chagas disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998; 88:150-155.

Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold KC, Bluestone JA. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med.* 1995; 181: 1145-1155.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem.* 1960; 235:1992-1997.

Lissoni P, Barni S, Tancini G, Ardizzoia A, Ricci G, Aldeghi R, Brivio F, Tisi E, Rovelli F, Rescaldani R. A randomised study with subcutaneous low-dose interleukin 2 alone vs interleukin 2 plus the pineal neurohormone melatonin in advanced solid neoplasms other than renal cancer and melanoma. *Br J Cancer.* 1994; 69:196-199.

Lissoni P, Pittalis S, Rovelli F, Vigorè L, Roselli MG, Brivio F. Interleukin-2, melatonin and interleukin-12 as a possible neuroimmune combination in the biotherapy of cancer. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1995; 9:63-66.

Lissoni P. The pineal gland as a central regulator of cytokine network. *Neuro Endocrinol Lett.* 1999; 20:343-349.

Liu RY, Zhou JN, van Heerikhuize J, Hofman MA, Swaab DF. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-epsilon4/4 genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:323-327.

Liu Y, Amarnath S, Chen W. Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4⁺CD25⁺ Tregs from thymic CD4⁺CD25⁻ single positive T cells. Transplantation. 2006; 82:953-964.

Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Segura JJ, Guerrero JM. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. Biotechnol Ther. 1993; 4:253-262.

Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. Eur J Pharmacol. 2001; 430:351-357.

Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. FASEB J. 2010; 24:3603-3624.

MacDermott RP. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. J Clin Immunol. 1999; 19:266-272.

MacFarlane JG, Cleghorn JM, Brown GM, Streiner DL. The effects of exogenous melatonin on the total sleep time and daytime alertness of chronic insomniacs: a preliminary study. Biol Psychiatry. 1991; 30:371-376.

Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. J Neuroimmunol. 1986; 13:19-30.

Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. J Pineal Res. 1993; 14: 1-10.

Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. Immunity. 2002; 17:167-178.

Marcaccini A, López-Peña M, Bermúdez R, Quiroga MI, Guerrero FH, Nieto JM, Alemañ N. Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. Vet Microbiol. 2007; 125:232-243.

Marcipar IS, Welchen E, Roodveldt C, Marcipar AJ, Silber AM. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. FEMS Microbiol Lett. 2003;220:149-154.

Maret W, Jacob C, Vallee BL,; Fischer, E.H. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:1936-1940.

Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, Ferreira BR, Cunha FQ, Cardoso CR, Silva JS. The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 2008; 10:825-833.

Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. Neuroimmunomodulation. 2007; 14:126-133.

Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunological Rev. 2004; 201:304-317.

Martin DL, Tarleton RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2005; 174:1594-1601

Martins E Jr, Ferreira AC, Skorupa AL, Afeche SC, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. J Leukoc Biol. 2004; 75:1116-1121.

Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, Rizzo LV, Silva JS. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 2004; 6:1133-1144.

Mathur M, Herrmann K, Qin Y, Gulmen F, Li X, Krimins R, Weinstock J, Elliott D, Bluestone JA, Padrid P. CD28 interactions with either CD80 or CD86 are sufficient to induce allergic airway inflammation in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;21:498-509.

Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. J Pineal Res. 2012 May 31. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x

Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends Biochem Sci. 1997; 22:477-481. Erratum in: Trends Biochem Sci. 1998; 23:87.

Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. Curr Med Chem. 2010; 17:4462-4481.

- Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J Parasitol. 1978; 64:475-482.
- Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. J Cell Biochem. 1993; 53:373-382.
- Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol 2004; 4:841-855.
- 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 TCR I T cells. Immunol Rev. 1989; 112:184-206.
- Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells: their knowns and unknowns. Immunol Cell Biol. 2011;89:346-351.
- Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R, Okumura K, Yagita H, Aoki T. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun. 2003; 71:3131-3137.
- Mocchegiani E, Vecchia S, Ancarani F, Scalise G, Fabris N. Benefit of oral zinc supplementation as an adjunct to zidovudine (AZT) therapy against opportunistic infections in AIDS. Int J Immunopharmacol. 1995a; 17:719-727.
- Mocchegiani E, Santarelli L, Muzzioli M, Muzzioli M, Fabris N. Reversibility of the thymic involution and of age-related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice. Int J Immunopharmacol. 1995b; 17: 703-718.
- Mocchegiani E, Perissin L, Santarelli L, Tibaldi A, Zorzet S, Rapozzi V, Giacconi R, Bulian D, Giraldi T. Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2. Int J Immunopharmacol. 1999; 21: 27-46.
- Molling JW, Kölgen W, Van der Vliet HJ, Boomsma MF, Kruizenga H, Smorenburg CH, Molenkamp BG, Langendijk JA, Leemans CR, Von Blomberg BM, Scheper RJ, Van den Eertwegh AJ. Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. Int J Cancer. 2005; 116:87-93.

- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-242.
- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; 176:213-254.
- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100:663-677.
- Murdoch DM, Venter WD, Van Rie A, Feldman C. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Res Ther.* 2007; 4: 9.
- Najim RA, Sharquie KE, Farjou IB. Zinc sulphate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an *in vitro* and animal study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:831-837.
- Nawar O, Akridge RE, Hassan E, El Gazar R, Doughty BL, Kemp WM. The effect of zinc deficiency on granuloma formation, liver fibrosis, and antibody responses in experimental schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47:383-389.
- Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 917:404-415.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 2000; 275:31311-31317.
- Olcese JM, Cao C, Mori T, Mamcarz MB, Maxwell A, Runfeldt MJ, Wang L, Zhang C, Lin X, Zhang G, Arendash GW. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res.* 2009; 47:82-96.
- 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.* 2007; 75:231-235.
- Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Pénit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol.* 1998; 10:371-378.

Pascutti MF, Bottasso OA, Hourquescos MC, Wietzerbin J, Revelli S. Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. Scand J Immunol. 2003; 58: 173-179.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas disease as a foodborne illness. J Food Prot. 2009; 72: 441-446.

Persengiev SP, Kyurkchiev S. Selective effect of melatonin on the proliferation of lymphoid cells. International Journal Biochem. 1993;25:441-444.

Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamssohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Cell Immunol. 1999; 193:90-98.

Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. Endocrine. 2005; 27:201-212.

Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. J Pineal Res. 2006; 41:136-141.

Prado Júnior JC, Leal MDE P, Anselmo-Franci JA, De Andrade Júnior HF, Kloetzel JK. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 1998; 84:100-105.

Prado JC JR, Levy AM, Leal MP, Bernard E, Kloetzel JK. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 1999; 85:826-829.

Prasad AS, Miale A JR, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. J Lab Clin Med. 1963; 61:537-549.

Prasad AS. Zinc: an overview. Nutrition. 1995; 11:93-99.

Prasad AS. Zinc: The Biology and therapeutics of an ion. Ann Intern Med. 1996; 125:142-143.

Prasad AS. Zinc and immunity. Mol Cell Biochem. 1998; 188:63-69.

Prasad AS. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. J Infect Dis. 2000; 182:62-68.

Prasad AS. Zinc: mechanisms of host defense. J Nutr. 2007; 137:1345-1349.

Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 2002; 2: 106-15. Erratum in: Nature Rev Immunol 2002; 2:215.

Provinciali M, Di Stefano G, Fabris N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. Int J Immunopharmacol. 1995;17:735-744.

Puertollano MA, Puertollano E, De Cienfuegos GA, De Pablo MA. Dietary Antioxidants: Immunity and Host Defense. Curr Top Med Chem. 2011; 11: 1752-1766.

Queiroz SL, Batista AA. Funções biológicas do óxido nítrico. Química Nova. 1999; 22.p.584-590.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. Clin Cardiol. 2000; 23:883-889.

Raulin, J. Etudes chimiques sur la vegetation, Annales des Sciences Naturelles. Botanique et Biologie vegetale. 1869; 11:293-299.

Reed SG. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: Molecular Approaches to Parasitology. New York: Wiley-Liss; 1995.p.443-445.

Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48:637-644.

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 1993; 49:192-200.

Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, 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. 1997; 83:165-172.

Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol*. 1995; 30:199-212.

Rink L, Gabriel P. Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2000; 59:541-552.

Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2007; 28:1-4.

Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:3-24.

Rodrigues V Jr, Agrelli GS, Leon SC, Silva Teixeira DN, Tostes S Jr, Rocha-Rodrigues DB. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2008; 10:29-37.

Rosales-Corral SA, Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Boga JA, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Korkmaz A, Ma S, Tan DX, Reiter RJ. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res*. 2012; 52:167-202.

Roth T. Appropriate therapeutic selection for patients with shift work disorder. *Sleep Med*. 2012; 13:335-341.

Rottenberg ME, Castaños-Velez E, De Mesquita R, Laguardia OG, Biberfeld P, Orn A. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. *Eur J Immunol*. 1996; 26:3203-3213.

Russomando G, De Tomassone MM, De Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59:487-491.

Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60:1407-1426.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155:1151-1164.

Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*. 2007; 317:627-629.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133:775-787.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol*. 2011; 707:3-17.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12:431-40.

Sandström B. Bioavailability of zinc. *Eur J Clin Nutr*. 1997; 51:17-19.

Santello FH, Frare EO, Dos Santos CD, Toldo MP, Kawasse LM, Zucoloto S, Do Prado JC JR. Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Pineal Res*. 2007; 42: 359-363.

Santello FH, Frare EO, Caetano LC, Alonso Toldo MP, Do Prado JC JR. Melatonin enhances pro-inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. *J Pineal Res*. 2008a; 45:79-85.

Santello FH, Frare EO, dos Santos CD, Caetano LC, Alonso Toldo MP, do Prado JC Jr. Suppressive action of melatonin on the TH-2 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res*. 2008b; 45: 291-296.

Santos CD, Toldo MP, Levy AM, Kawasse LM, Zucoloto S, Do Prado JC. JR. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. *Acta Trop*. 2007a; 102:143-150.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 246-251.

Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-Da-Cruz DA, Monteiro ES, Perez AR, Aoki MDP, Bottasso O, Guinázú N, Silva-Barbosa SD, Gea S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18:107-124.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010; 115:14-21.

- Scorza C, Scorza JV. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after infection. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1972; 14:171-177.
- Scott BJ, Bradwell AR. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. Clin Chem. 1983; 29:629-633.
- Seddon B, Mason D. The third function of the thymus. Immunol Today. 2000; 21:95-99.
- Seve M, Chimienti F, Favier A. Role of intracellular zinc in programmed cell death. Pathol Biol (Paris). 2002; 50: 212-221.
- Shankar AH, Kumar N, Scott AL. Zinc-deficiency exacerbates experimental malaria infection in mice. FASEB J. 1995; 9:4269.
- Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. Am J Clin Nutr. 1998; 68:447-463.
- Sharquie KE, Najim RA, Farjou IB, Al-Timimi DJ. Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 2001; 26:21-26.
- Sharquie KE, Najim RA. Disseminated cutaneous leishmaniasis. Saudi Med J. 2004; 25:951-954.
- Shi HN, Scott ME, Stevenson MM, Koski KG. Zinc deficiency impairs T cell function in mice with primary infection of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda). Parasite Immunol. 1994; 16:339-350.
- Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folha Clínica Biol São Paulo. 1953; 20:191-201.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1992; 175:169-174.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol Rev. 2003; 55:325-395.

Singh KP, Zaidl SI, Raisuddin S, Saxena AK, Murthy RC, Ray PK. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1992; 14:813-840.

Skwarło-Sońta K. Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 1996; 56:341-357.

Skwarlo-Sonta, K. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002; 23:61-66.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 351:152-166.

Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1997;17:2653-2657.

Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol*. 2001;159:703-709.

Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*. 2004; 72:5283-5291.

Speh JC, Moore RY. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Brain Res Dev Brain Res*. 1993; 76:171-181.

Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther*. 2008; 7:189-203.

Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, Maestroni GJ. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation*. 2008b; 15:93-101.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2011; 5:109-123.

- Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*. 1989; 45:922-932.
- Sunderman FW JR. The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci*. 1995; 25:134-142.
- Sze SF, Liu WK, Ng TB. Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. *J Neural Transm Gen Sect*. 1993; 94:115-126.
- Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol*. 2001; 31:1122-1131.
- Tafari WL. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American Trypanosomiasis. *Virchows Arch* 1971; 354: 136-149
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005; 17:1-14.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT. 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*. 2000;2:851-866.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007;42:28-42.
- Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 171:3348-52.
- Taliaferro W, Pizzi T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 1995; 96: 199-226.
- Tarleton RL. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*. 1991; 73:106-109.

- Tasci S, Sengil AZ, Altindis M, Arisoy K. The effect of zinc supplementation in experimentally induced *Toxoplasma gondii* infection. J Egypt Soc Parasitol. 1995; 25:745-751.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol. 2002; 18: 262-265.
- Terenzi F, Diaz-Guerra MJ, Casado M, Hortelano S, Leoni S, Boscá L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. J Biol Chem. 1995; 270: 6017-6021.
- Thomson L, Gadelha FR, Peluffo G, Vercesi AE, Radi R. Peroxynitrite affects Ca^{2+} transport in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1999; 98:81-91.
- Todd WK, Elvehjem CA, Hart EB. Zinc in the nutrition of the rat. Am J Physiol. 1934; 107:146-156.
- Tomat AL, Inserra F, Veiras L, Vallone MC, Balaszczuk AM, Costa MA, Arranz C. Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008; 295:543-549.
- Tostes Júnior S, Lopes ER, Pereira FE, Chapadeiro E. Human chronic chagasic myocarditis: quantitative study of CD4^{+} and CD8^{+} lymphocytes in inflammatory exudates. Rev Soc Bras Med Trop. 1994; 27: 127-134.
- Tostes S Jr, Bertulucci Rocha-Rodrigues D, de Araujo Pereira G, Rodrigues V Jr. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. Int J Cardiol. 2005; 99:233-237.
- Treves S, Trentini PL, Ascanelli M, Bucci G, Di Virgilio F. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. Exp Cell Res. 1994; 211:339-343.
- Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. Biometals. 2001; 14:315-330.
- Tsunoda I, Lane TE, Blackett J, Fujinami RS. Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10. Mult Scler. 2004; 10: 26-34.

Tudor R, Zalewski PD, Ratnaike RN. Zinc in health and chronic disease. *J Nutr Health Aging*. 2005; 9:45-51.

Umezawa K, Nakazawa K, Uchihata Y, Otsuka M. Screening for inducers of apoptosis in apoptosis-resistant human carcinoma cells. *Adv Enzyme Regul*. 1999; 39:45-56.

Uyemura SA, Albuquerque S, Curti C. Energetics of heart mitochondria during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995; 27:1183-1189.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S JR, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000;156:1805-1809.

Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*. 1993; 73:79-118.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Immun*. 1994; 62:5177-5182.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Leal BZ, Meltz ML. Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes. *Mutat Res*. 1996; 351:187-192.

Villegas EN, Elloso MM, Reichmann G, Peach R, Hunter CA. Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1999;163:3344-3353.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁻CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25^{High} regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2005; 62:297-308.

Walsh GM. Targeting airway inflammation: novel therapies for the treatment of asthma. *Curr Med Chem*. 2006;13:3105-3111.

Wang X, Tanus-Santos JE, Reiter CD, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Gladwin MT. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:11477-11482.

Weiss G, Wachter H, Fuchs D. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol Today*. 1995; 16:495-500.

Weiss G, Widner B, Zoller H, Fuchs D. The immunobiology of zinc and the kidney. *Immunol Today*. 1998; 19:193-194.

Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*. 2002; 39:537-545.

Wirth JJ, Fraker PJ, Kierszenbaum F. Zinc requirement for macrophage function: effect of zinc deficiency on uptake and killing of a protozoan parasite. *Immunology*. 1989; 68:114-119.

World Health Organization (WHO). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases ISBN 978 92 4 1564090. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/index.html

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284:555-556.

Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science*. 1996;273:1862-1864.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:101-107.

Yousef MI, El-Hendy HA, El-Demerdash FM, Elagamy EI. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology*. 2002; 175:223-234.

Zalewski PD, Forbes IJ. Intracellular zinc and the regulation of apoptosis. In: Lavin M, Watters D. *Programmed Cell Death: The Cellular and Molecular Biology of apoptosis*. Melbourne: Harwood Academic Publishers; 1993.p.73-86.

Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep.* 2009; 61:383-410.

Zhdanova IV, Lynch HJ, Wurtman RJ. Melatonin: a sleep-promoting hormone. *Sleep.* 1997; 20:899-907.

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.112.53.4), intitulado "Avaliação da Sulpimentação de Zinco e Melatonina Durante a Infecção Experimental por *Trypanosoma cruzi*", de autoria de **Vânia Brazão** e de **José Clóvis do Prado Junior**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.03.2009.

Colaboradores: Fabrícia Helena Santello
Leony Cristina Caetano
Marina Del Vecchio

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.112.53.4), entitled: "Avaliação da Sulpimentação de Zinco e Melatonina Durante a Infecção Experimental por *Trypanosoma cruzi*", by **Vânia Brazão** and **José Clóvis do Prado Junior**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, March, 3 2009.

Ribeirão Preto, 12 de junho de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretaria da CEUA
Maria Angélica Depiro