UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados com *Trypanosoma cruzi*

Fabricia Helena Santello

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados com *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Fabricia Helena Santello
Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Jr

Ribeirão Preto

2009

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santello, Fabricia Helena
Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2009.
122p.: il.;30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Prado Jr., José Clóvis

1. Melatonin, 2. Sexual hormones, 3. *Trypanosoma cruzi*, 4. orchietomy, 5. Immunologyc assays

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Fabricia Helena Santello

Título do trabalho: Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados com *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Jr.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho

Aos meus pais Luiz Carlos Santello e Elizabeth Martins Valdastri Santello e ao meu irmão Luiz Elias Santello que um dia sonharam e hoje compartilham este momento de conquista comigo.

Ao Ricardo Faleiros pelo apoio, companheirismo e carinho.

Todos eles são os pilares de minha vida, sem os quais nenhum sonho seria possível e nem valeria a pena.

A Deus por sempre me iluminar, guiar e principalmente proteger... graças a ele... mesmo quando penso ter tomado decisões erradas, tudo acaba dando certo... mesmo quando questiono o porquê de algumas dificuldades e desafios, ele me mostra a saída e como vencer estes obstáculos...e a cada porta que se fecha, em breve outras de abrem...

AGRADECIMENTOS

Considero a elaboração de uma tese de doutorado um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e estresse sejam predominantemente individuais. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

Foi há 3 anos que comecei algo... Algo que agora apresento com um sentimento de alívio como há muito não sentia!

Hoje eu sei que a aprendizagem é muito importante... e aprender o que ainda não sei é uma tarefa árdua e incessante. Ah! E como existem coisas a serem aprendidas! E por isso serei sempre aprendiz. Eu creio que esta parte de agradecimentos é uma tarefa difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças e por esquecimento não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para o trabalho. Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Meus agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. José Clóvis do Prado Júnior, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida e principalmente pelo convívio nestes três anos de trabalho. Além disso, estamos vencendo juntos mais uma etapa destes 13 anos de convivência, parceria e acima de tudo... uma amizade verdadeira, leal e duradoura.

Em especial às amigas e companheiras de longos dias de experimento: Leony Cristina Caetano, Marina Del Vecchio Filipin, Vânia Brazão e Luana Caetano. A alegre convivência, as sugestões, os momentos de dificuldades e desesperos – mas “SEMPRE JUNTAS” - tornou-as essenciais no desenvolvimento deste trabalho. A vocês muito obrigada!!!!! Minha amizade e gratidão eternas...

Há também um amigo muito querido, que não posso deixar de agradecer, Eduardo Osório Frare, companheiro de todas as horas e um estimulador de toda esta conquista.

Um obrigada especial à Miriam Paula Alonso Toldo, que pela excelência técnica, sempre auxiliou em todas as etapas dos experimentos.

Aos amigos HI-5 – Fernanda Scarmato De Rosa, Gilmarcio Zimmermann Marins, Helene Jorge De Rosa, Regilene Steluti e Sally Cristina Monteiro Moutinho por toda a força e apoio, que somente os reais amigos são capazes de oferecer, sem pedir nada em troca, apenas pelo simples prazer de me ver vencer...

À amiga Madeleine Jaice Tunes Bonfim pela amizade sólida e verdadeira, pela convivência, energia positiva, carinho e paciência.

À amiga Vânia Mazozo e todas as pessoas queridas, que fazem parte de minha convivência e partilham desta caminhada, que sempre me apoiaram e entenderam minhas ausências em vários momentos.

Às amigas: Adriana Prado Vazon, Kárida Danieli Oliveira, Tatiane Christine Sanches, Lígia Roda, Vanessa Oliveira Costa, Sabrina Rocha e todos os colegas que conviveram com minhas dificuldades durante estes três anos e colaboraram para esta realização.

A todos os pós-graduandos do laboratório de Parasitologia: Christian Collins Kuehn, Daniele da Silva Ferreira, Kelly Cristina Rodrigues, Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira, Mariana Bryan Augusto, Mariana Rosa da Silva, Viviane Rodrigues Esperandim, e em especial à Carla Domingues dos Santos Sponchiado pelo apoio e auxílio técnico.

Ao laboratório de Parasitologia da FCFRP por fornecer uma excelente infra-estrutura, possibilitando a realização dos diversos experimentos.

A todos os docentes da disciplina de Parasitologia, que participaram ativamente do desenvolvimento deste trabalho, fornecendo todo seu conhecimento para a conclusão desta pesquisa e sempre me encorajaram para continuar, mesmo diante das dificuldades.

Aos demais técnicos do laboratório de Parasitologia, que forneceram condições adequadas para o desenvolvimento dos trabalhos: Antônia Ferreira Cruz e Geórgius Luiz de Oliveira.

Aos técnicos Maraísa Palhão Verri, José Maria Puga e Paulo Sérgio de Carvalho que também participaram de etapas importantes deste trabalho.

A Fabiana Rossetto de Morais e Walter Miguel Turato – profissionais experientes, os quais realizaram com extrema dedicação e precisão a etapa referente às leituras de citometria de fluxo.

Às secretárias Amélia Regina Azevedo Aguena Albuquerque, Vânia Cláudia de Albuquerque e Wania Maria Tavares da Silva pela amizade e dedicação.

Aos funcionários da Pós-Graduação da FCFRP/USP Rosana Ferreira L.S. Florêncio**,** Ana Lúcia Turatti Barbosa, Eleni Angeli Passos, Henrique Theodoro, Rossana M. Ribeiro por toda dedicação e profissionalismo.

Aos funcionários Sr. Antonio Luiz Rodrigues e Sr. Clóvis Reginaldo David, que cuidaram de minha segurança durante as noites, finais de semana e feriados em que realizei experimentos, com muito carinho e dedicação.

A Laura Midore Kawasse e Márcia Aparecida Ferreira Oliva, técnicas do laboratório de Patologia da FMRP/USP, pela colaboração e dedicação na confecção das lâminas de histologia. Agradeço também ao docente responsável pelo laboratório, que nos permitiu a realização desta etapa e colaborou grandemente na discussão dos dados obtidos.

A Carlos Artério Sorgi, especialista em Laboratório de Imunologia da FCFRP/USP, que muito contribuiu durante os ensaios imunológicos realizados, sempre atencioso e prestativo, nos auxiliando em muitos momentos decisivos. À técnica Érika Vitaliano Garcia de Souza, também do Laboratório da disciplina de Imunologia, pela dedicação em nos auxiliar em muitos momentos de dúvidas.

Aos ratos Wistar, modelos experimentais adotados, que involuntariamente doaram suas vidas para a realização deste trabalho em prol da busca de terapias para uma doença que ainda aflige milhões de seres humanos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e por fornecer estrutura física e científica de excelência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) - pelo apoio científico e financeiro, o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

"A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou a sua mente é seu para sempre"
(Louis L. Amour)

"Tuas forças naturais, as que estão dentro de ti, serão as que curarão suas doenças"
(Hipócrates)

RESUMO

SANTELLO, F. H. **Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados com *Trypanosoma cruzi.*** 2009. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os esteróides gonadais exercem importantes influências no direcionamento da resposta imune do hospedeiro frente à infecção. Alterações decorrentes de sua ausência ou reposição podem significar em uma evolução distinta de determinada parasitose. Existe também uma relação entre a produção de melatonina e o ritmo de atividade do sistema imune. A resposta imune depende de uma interação entre inúmeros hormônios que irão agir sinergicamente com distintas células imunes. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito dos hormônios sexuais masculinos, através da orquiectomia, e da administração oral de melatonina sobre a resposta imune de ratos Wistar machos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Inúmeros parâmetros foram avaliados, entre eles: parasitemia, histologia cardíaca, peso dos animais e órgãos, linfoproliferação de timócitos e esplenócitos, quantificação de macrófagos, dosagem de óxido nítrico, citometria de fluxo para avaliação das populações de $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$; e ensaios imunológicos como IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-12, IL-10. Observou-se em todos os parâmetros analisados a ação sinérgica da melatonina e da orquiectomia sobre o sistema imune, favorecendo uma resposta positiva contra o parasita na fase aguda da infecção. Dessa forma, concluiu-se que a melatonina e a redução dos hormônios sexuais masculinos exerceram um papel imunoestimulador importante, que se refletiu em uma resposta mais efetiva do hospedeiro durante a infecção experimental.

Palavras-chaves: Melatonina, hormônios sexuais, *Trypanosoma cruzi*, orquiectomia, ensaios imunológicos.

ABSTRACT

SANTELLO, F. H. **Effect of melatonin administration in rats orchiectomized and infected with *Trypanosoma cruzi.*** 2009. 122f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Gonadal steroids exert important influence in the host immune response during infection. Changes resulting from the absence or replacement of these hormones may represent a distinct evolution of a particular parasite. There is also a relationship between melatonin production and the rhythmic activity of the immune system. The immune response depends on the interaction of many hormones that will act synergistically with other immune cells. The objective of this research was to evaluate the effect of male sex hormones through orchiectomy, and oral administration of melatonin on the immune response of male Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, during the acute phase of experimental Chagas'disease. Several parameters were evaluated among them: quantification of blood parasites, heart histology, body weight of animals and organs, lymphoproliferation of thymocytes and splenocytes, quantification of peritoneal macrophages, nitric oxide concentration, alterations in $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$ lymphocyte populations by flow cytometry and immunological assays, as IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-12, IL-10. It was observed in all parameters examined the synergistic action of melatonin and orchiectomy on the immune system, promoting a positive response against the parasite in the acute phase of infection. Thus, it was concluded that melatonin and the absence of male sex hormones exerted an important immunostimulating role, which reflected a more effective host's response during the experimental infection.

Key words: Melatonin, sexual hormones, *Trypanosoma cruzi*, orchiectomy, immunological assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Peso do coração de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção..... p.34

Figura 2. Peso do baço de ratos *Wistar* não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção..... p.36

Figura 3. Peso do timo de ratos *Wistar* não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção..... p.37

Figura 4. Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dia após a infecção..... p.38

Figura 5. Número total de leucócitos de ratos *Wistar* não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção..... p.40

Figura 6. Concentração de NO (μM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS (10μg/mL), coletadas de ratos *Wista*r machos controles (não infectados) durante 7º, 14° e 21º dias p.43

Figura 7. Concentração de NO (μM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS (10μg/mL), coletadas de ratos *Wista*r machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante 7º, 14° e 21º dias..... p.45

Figura 8. Proliferação de timócitos induzidos por ConA (1µg/mL) de ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda (7°, 14° e 21° dia após infecção)..... ..... p.47

Figura 9. Proliferação de esplenócitos induzidos por ConA(1µg/mL) de ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda (7°, 14° e 21° dia após infecção)..... p.49

Figura 10. Análise da população de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ do baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção p.51

Figura 11. Análise da população de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ do baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção p.53

Figura 12. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos não infectados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X)..... p.55

Figura 13. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos não infectados Sham, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X)..... p.56

Figura 14. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos não infectados orquiectomizados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X)..... p.57

Figura 15. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X)..... p.58

Figura 16. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados Sham, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X)..... ..... p.60

Figura 17. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados orquiectomizados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X)..... p.62

Figura 18. Concentração de TGF-β1 determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.66

Figura 19. Concentração de TNF-α determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.68

Figura 20. Concentração de IFN-γ determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.70

Figura 21. Concentração de IL-2 determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.72

Figura 22. Concentração de IL-4 determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.74

Figura 23. Concentração de IL-10 determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.76

Figura 24. Concentração de IL-6 determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.78

Figura 25. Concentração de IL-12 determinada no soro de ratos *Wista*r machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção..... p.80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais..... p.22

Tabela 2. Peso corpóreo de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com 1x 10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o pico de parasitemia (7º dia após o inoculo)..... p.33

Tabela 3. Contagem global de macrófagos peritoniais em ratos *Wistar* machos controles (não infectados) e infectados com 1x10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dia após a infecção..... p.41

Tabela 4. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos *Wistar* machos infectados com 1x 10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º e 14º dia após a infecção..... p. 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHEA	dehidroepiandrosterona
E2	Estradiol
GABA	ácido gama aminobutírico
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
HIOMT	hidroxindol-orto-metiltransferase
IgG e IgM	Imunoglobulinas dos tipos G e M
IL-2, -4, -6, -10, -12	Interleucinas 2, 4, 6, 10 e 12
LPS	lipopolissacarídeos
ML 1, 1b, 2 e MT 1, 2 e 3	receptores de membrana para melatonina
MLT	Melatonina
NK	*Natural killer*
OMS	Organização Mundial de Saúde
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
Th1 e Th2	células T *helper* 1 e 2
TRH	hormônio liberador de tireotrofina

SUMÁRIO

Resumo..... i

Abstract..... ii

Lista de Figuras..... iii

Lista de Tabelas..... vii

Lista de abreviaturas e siglas..... viii

1. INTRODUÇÃO..... p.1

1.1 Doença de Chagas..... p.1

1.2 Doença de Chagas e Sistema Imune..... p.6

1.3 Hormônios sexuais, Infecção e Resposta Imune..... p.9

1.4 Glândula Pineal..... p.11

1.5 Melatonina..... p.13

1.6 Melatonina e Sistema Imune..... p.15

2. OBJETIVOS..... p.19

3. MATERIAL E MÉTODOS..... p.21

3.1 Animais e Infecção por *T. cruzi*..... p.21

3.1.1 Animais utilizados..... p.21

3.1.2 Orquiectomia..... p.22

3.1.3 Dias de Experimento..... p.23

3.1.4 Cepa de *T. cruzi*..... p.23

3.2 Administração de Melatonina..... p.23

3.3 Pesagem dos Animais e Órgãos..... p.23

3.4 Eutanásia dos Animais..... p.24

3.5 Parasitemia..... p.24

3.6 Coleta de Sangue..... p.24

3.7 Contagem Global de Leucócitos..... p.24

3.8 Contagem de Macrófagos Peritoniais..... p.25

3.9 Quantificação de Óxido Nítrico..... p.25

3.10 Linfoproliferação de Timócitos..... p.26

3.11 Linfoproliferação de Esplenócitos..... p.26

3.12 Análise Fenotípica das Populações Celulares por Citometria de Fluxo..... p.26

3.13 Histologia do Coração..... p.27

3.14 Intensidade do Parasitismo Tecidual..... p.28

3.15 Dosagens de Citocinas..... p.28

3.15.1 Dosagens de TGF-β1, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10..... p.28

3.15.2 Dosagem de IL-6..... p.29

3.15.3 Dosagem de IL-12..... p.30

3.16 Taxa de Mortalidade..... p.31

3.17 Análise Estatística..... p.31

4. RESULTADOS..... p.33

4.1 Peso Corpóreo..... p.33

4.2 Peso dos Órgãos..... p.34

4.2.1 Peso do Coração..... p.34

4.2.2 Peso do Baço..... p.36

4.2.3 Peso do Timo..... p.37

4.3 Parasitemia..... p.38

4.4 Leucócitos Totais..... p.40

4.5 Contagem Global de Macrófagos Peritoneais..... p.41

4.6 Dosagem de Óxido Nítrico..... p.43

4.6.1 Grupos Não Infectados p.43

4.6.2 Grupos Infectados p.45

4.7 Linfoproliferação de Timócitos..... p.47

4.8 Linfoproliferação de Esplenócitos..... p.49

4.9 Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de fluxo..... p.51

4.9.1 População celular T $CD3^+CD4^+$ p.51

4.9.2 População celular T $CD3^+CD8^+$ p.53

4.10 Histologia Cardíaca p.55

4.10.1 Animais não infectados não tratados (C) e tratados com melatonina (CM)... p.55

4.10.2 Animais sham não tratados (CSH) e sham tratados com melatonina (CSHM) p.56

4.10.3 Animais orquiectomizados não tratados (COR) e orquiectomizados tratados com melatonina (CORM) p.57

4.10.4 Animais infectados não tratados (I) e tratados com melatonina (IM)..... p.58

4.10.5 Animais infectados Sham não tratados (ISH) e tratados com melatonina (ISHM) p.60

4.10.6 Animais infectados orquiectomizados não tratados (IOR) e tratados com melatonina (IORM)..... p.62

4.11 Intensidade Parasitária Cardíaca..... p.64

4.12 Dosagem de Citocinas..... p.66

4.12.1 TGF-β1..... p.66

4.12.2 TNF-α..... p.68

4.12.3 IFN-γ..... p.70

4.12.4 IL-2..... p.72

4.12.5 IL-4..... p.74

4.12.6 IL-10..... p.76

4.12.7 IL-6..... p.78

4.12.8 IL-12..... p.80

4.13 Mortalidade..... p.82

5. DISCUSSÃO..... p.84

6. CONCLUSÕES..... p. 92

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... p.95

ANEXO A - CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)..... p.122

1– INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma antropozoonose que assola principalmente as populações rurais pobres e também uma das patologias parasitárias de mais larga distribuição da América Latina, com impacto social e econômico de peso bem maior do que os efeitos combinados de outras doenças parasitárias como malária, leishmaniose e esquistossomose. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem cerca 17 milhões de pessoas infectadas nas Américas, com 3 a 3,3 milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual de 200 mil casos em 15 países. Aproximadamente 6 milhões encontram-se no Brasil (WHO, 2003). A prevalência, a incidência e a taxa de mortalidade associadas à doença de Chagas apresentaram consideráveis variações nas últimas décadas, devido principalmente ao impacto de programas de controle, migrações de populações rurais e urbanas além de mudanças sócio-econômicas (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006).

A importância dessa endemia se reflete no sentido econômico, onde é responsabilizada pelas taxas de aposentadoria precoce, como uma conseqüência direta da doença. A tripanosomíase americana é um exemplo típico de uma injúria orgânica resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente, das más condições econômicas e sociais que influenciam fortemente a distribuição social dessa parasitose, decorrentes de deficiências na qualidade de vida do homem no tocante à saúde e à educação, perpetuando os ciclos de pobreza e enfermidade (VINHAES & DIAS, 2000).

O agente etiológico da doença de Chagas é o flagelado heteroxênico *Trypanosoma cruzi*, que possui um ciclo evolutivo complexo e compreende diferentes estágios de desenvolvimento; entre suas formas morfogenéticas estão: a forma epimastigota e tripomastigota metacíclica infectante, presentes no inseto vetor e as formas amastigotas e tripomastigota sanguícolas presentes no hospedeiro vertebrado (TANOWITZ et al., 1992).

O ciclo de vida de *T. cruzi* ocorre na natureza entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. O homem passou a fazer parte do ciclo de transmissão, quando invadiu o ecótopo natural compreendido pelos vetores e seus hospedeiros mamíferos. Dessa forma, os vetores passaram a co-habitar as instalações humanas colonizando os mais variados locais como buracos ou fendas em paredes, atrás de quadros ou pintura solta. Nota-se maior incidência em casas de condições precárias como as de pau a pique, sapé, madeira ou barro,

sendo mais freqüente, nas zonas rurais e entre a população de baixa renda (RODRÍGUEZ-BONFANTE et al., 2007).

Os triatomíneos possuem hábitos geralmente noturnos e, durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerem os tripomastigotas circulantes, que, após multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo, são eliminados nas fezes por ocasião de um novo repasto, podendo infectar novos hospedeiros vertebrados. A transformação e todo desenvolvimento do flagelado no vetor estão relacionados à espécie do triatomíneo e às diferentes cepas do parasita (GARCIA & DVORAK, 1982).

O homem, como outros animais, se infecta quando formas tripomastigotas metacíclicos (eliminadas juntamente com as fezes do triatomíneo, hospedeiro invertebrado, sobre a pele do hospedeiro vertebrado) penetram pela lesão da picada ou por membranas mucosas (CHAGAS, 1933). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas de *T.cruzi* invadem diferentes tipos de células, principalmente do sistema fagocitário mononuclear incluindo os macrófagos, onde irão se multiplicar sob a forma de amastigotas (COSTA et al., 2006). Esta via pode ser considerada a forma mais importante de transmissão da doença de Chagas nas Américas (DIAS, 2000). Outros mecanismos de infecção são: transmissão congênita, amamentação, via transfusional e via oral; esta última, ocorrendo de maneira esporádica e circunstancial, através de alimentos contaminados com o parasita Existem também formas de transmissões excepcionais como: transmissão acidental em laboratório, por transplantes de órgãos, oral e sexual (BRENER et al., 2000; DIAS, 2006).

T.cruzi mostra 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 como a idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas, morfológicas e biológicas da cepa infectante e fatores externos como temperatura ambiental (BRENER et al., 2000). Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção é controlada através da resposta imune dirigida contra o parasita, determinando o desaparecimento dos tripomastigotas sanguícolas. Estes indivíduos passam para uma fase assintomática onde somente exames sorológicos podem detectar a presença indireta do parasita. Dependendo do tipo da cepa e estado imunológico do hospedeiro, dentre outros fatores, uma proporção deles desenvolve doença cardíaca e/ou digestiva, vários anos após a contaminação, enquanto a maioria permanece assintomática (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1981).

ANDRADE et al. (1970) relataram a existência de cepas com predominância de formas delgadas e tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com maior freqüência esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea, apresentando altos e precoces picos parasitêmicos. Apesar de serem mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes, caracterizam-se por apresentar uma elevada taxa de mortalidade na grande maioria dos animais experimentais infectados na fase aguda da infecção. Entretanto, existem cepas que apresentam característica morfológica larga, marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (MELO & BRENER, 1978). Esse tipo de conformação morfológica confere a estas cepas uma maior resistência aos anticorpos circulantes. Como conseqüência, os tripomastigotas permanecem por mais tempo na corrente circulatória determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

O curso da doença de Chagas no homem pode apresentar as fases: aguda e crônica. O início da fase aguda acontece logo após a entrada do parasita no organismo do hospedeiro (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006) e caracteriza-se normalmente por apresentar parasitemias abundantes (MELNIKOV et al., 2005) e pela relativa facilidade com que se evidencia o parasita tanto no sangue periférico, mediante métodos diretos, ou por métodos sorológicos através da presença de IgM.

A parasitemia sangüínea é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, necessária para o estabelecimento da correlação anátomo-patológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993). Sendo assim, o estudo da fase aguda da infecção induzida por *T. cruzi* pode ser de grande importância, considerando que diferentes autores sugerem que muitas lesões tardias são influenciadas pelo curso da doença durante esta fase. Por outro lado, o estudo do comportamento de várias cepas de *T. cruzi* em diferentes hospedeiros experimentais parece indicar que a cepa do parasita influencia nas características da infecção aguda (CASTRO & BRENER, 1985).

As manifestações clínicas na fase aguda, quando presentes, aparecem sob a forma de reações locais como chagoma de inoculação (inoculação cutânea) e o sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral) seguidos por febre, hepatomegalia e esplenomegalia (MONCAYO & YANINE, 2006). Alguns casos podem desenvolver complicações neurológicas, cardíacas e pulmonares durante esse período (AUGER et al., 2002; MELNIKOV et al., 2005),

especialmente em crianças menores de 15 anos e pacientes imuno-comprometidos (FERREIRA & BORGES, 2002).

A fase crônica acontece quando as manifestações clínicas da fase aguda (se presentes) desaparecem e o número de formas tripomastigotas no sangue periférico diminui, chegando a níveis indetectáveis. A resposta imune do hospedeiro é responsável por essa queda da parasitemia sanguínea, principalmente em pacientes não tratados (CARDONI & ANTÚNEZ, 2004). Durante a fase crônica da doença de Chagas, muitos indivíduos infectados permanecem assintomáticos, sem alterações no coração, esôfago ou cólon. Esse período sem manifestações clínicas é conhecido como forma indeterminada da doença e cerca de 50 a 70% dos pacientes ficam nesse estágio pelo resto da vida (PINTO DIAS, 1995).

Entretanto, uma minoria (30%) dos indivíduos que permanecem assintomáticos durante um determinado período pode, eventualmente, vir a desenvolver sintomas da doença caracterizados por distúrbios no sistema digestivo, nervoso e no coração, ocasionalmente fatais, além de outras alterações sistêmicas como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e linfocitose (GARCIA et al., 2005).

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, podendo reproduzir nesses modelos, os distintos aspectos patológicos da doença humana (BRENER & CHIARI, 1963; BORGES et al., 1982; BORGES et al., 1992a; CARDILLO et al., 1996; BRENER et al., 2000; DO PRADO et al., 1998; DO PRADO et al., 1999; DOST et al., 2002). A utilização de roedores em pesquisa permitiu uma detalhada descrição celular, molecular e fenomenológica disponível para o sistema imune de mamíferos (SANTOS et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2005; CAETANO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; SANTELLO et al., 2007; SANTOS et al., 2007; BRAZÃO et al., 2008a; BRAZÃO et al., 2008b; FILIPIN et al, 2008).

O estudo histológico sistemático realizado em roedores infectados por *T.cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, muito semelhantes às causadas pela doença humana (BRENER et al., 2000). Dependendo de características biológicas e genéticas das cepas e subespécies, o parasita pode apresentar comportamentos peculiares, quando inoculado em animais experimentais. A interação parasita-hospedeiro tem participação fundamental na doença de Chagas, influenciando na modulação, evolução e morbidade da infecção (BRENER & CHIARI, 1963; TOLEDO et al., 2004).

O tratamento da doença de Chagas pressupõe uma terapêutica específica contra o parasita (visando eliminá-lo) e uma sintomática (para atenuação dos sintomas, como por exemplo, o uso de antiarrítmicos, para o coração). Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo dessa parasitose, o seu tratamento apresenta, ainda hoje, muitos problemas.

Alguns medicamentos são capazes de eliminar *T. cruzi* no período inicial da doença, trazendo esperanças a muitas pessoas infectadas. Em decorrência, porém, dos inúmeros efeitos colaterais dos medicamentos até hoje disponíveis, compete ao médico decidir sobre a necessidade e a conveniência do tratamento de cada caso de forma individual; as lesões cardíacas e em outros órgãos, que já estiverem presentes são irreversíveis e não serão eliminadas com a erradicação do parasita. Cuidados médicos especiais deverão ser instituídos frente aos sinais mais graves da doença.

No final da década de 1960, surgiram, respectivamente, o nifurtimox e o benzonidazol, as primeiras drogas efetivas para o tratamento da fase aguda da infecção chagásica humana, porém com índices de cura muito baixos na fase crônica da doença. O seu emprego em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias) causa importantes efeitos colaterais indesejáveis (COURA & CASTRO, 2002). O nifurtimox que foi amplamente empregado deixou de ser usado em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais que apresentava, estando atualmente fora do mercado.

Transplantes de órgãos colocaram ainda mais em cena a necessidade da utilização de drogas mais eficazes. Quando um indivíduo portador de doença de Chagas recebe um transplante, ou pacientes imunodeprimidos, esperam-se, quase sempre uma reativação da carga parasitária nesses indivíduos. Benzonidazol, nifurtimox e allopurinol, em tais eventualidades, demonstraram capacidade em conter a exacerbação, configurando outra indicação válida concernente ao uso das drogas. Outra indicação incontestável corresponde ao atendimento de vítimas de acidentes laboratoriais, exigindo início precoce do tratamento. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana gerou nos últimos anos mais uma importante preocupação devido ao grande número de portadores, com estabelecimento de situação propícia para reativação da infecção parasitária, com conseqüente agravamento da patologia, principalmente a miocardite e acometimento do sistema nervoso central (COURA & CASTRO, 2002; BRITO et al., 2003; AMATO-NETO, 1998).

Não existe vacina contra a doença de Chagas, e a melhor maneira de enfrentá-la ainda se dá por meio da prevenção e do controle, combatendo sistematicamente os vetores mediante o emprego de inseticidas eficazes, melhoria das habitações e saneamento básico, eliminação dos animais domésticos infectados, controle e descarte do sangue contaminado pelo parasita e seus derivados (BRENER et al., 2000).

1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune

As diferentes manifestações clínicas e patológicas da Doença de Chagas no homem se devem a maior ou menor eficiência da resposta imune do hospedeiro dirigida ao parasita que irá controlar os níveis parasitêmicos na fase aguda da infecção e, assim, limitará os danos teciduais durante a fase crônica (ALIBERTI et al. 1996; MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006). Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T.cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas. Em conseqüência, o parasita passa a ser continuamente combatido e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. Hoje está bem estabelecido que a ativação de células e mecanismos efetores do sistema imune durante a infecção pode ser responsável tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelo processo inflamatório exacerbado que resultarão nos sintomas característicos da fase aguda da doença, como febre, esplenomegalia e miocardites (CAMPOS & GAZZINELLI, 2004).

A resposta inflamatória e as lesões celulares, ao lado das alterações da matriz extracelular, dos fenômenos degenerativos e também de processos auto-imunes (GATTASS et al., 1988; PALOMINO et al., 2000; CUNHA-NETO et al., 2006; HYLAND & ENGMAN, 2006), constituem os processos patológicos fundamentais da doença de Chagas (LOPES, 2002).

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T.cruzi* sensibiliza diferentes tipos de respostas imunes, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (SACKS & SHER, 2002). A mobilização do sistema imune é importante, mas 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).

A imunidade celular é o principal mecanismo de controle do parasitismo durante as primeiras semanas de infecção causada por *T.cruzi*. A resistência ao parasita envolve particularmente a participação de linfócitos T CD4+ (Th1) e a ativação de macrófagos por citocinas, principalmente interferon-gama (IFN-γ) (ABRAHAMSOHN, 1995). Contrariamente, a ativação de células Th2 resulta em sobrevivência aumentada do parasita e exacerbação das lesões causadas por ele, em virtude das ações supressoras das citocinas características desta resposta, especialmente IL-4 e IL-10 (KUMAR & TARLETON, 2001; HOFT et al., 2000).

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, por *T. cruzi*, inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI et al., 1996). *T.cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, induzindo a produção de IL-12. Essa citocina além de atuar sobre as células "*natural killer*" (NK), estimula a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4+ em células Th1 produtoras de IFN-γ (ALIBERTI et al., 1996; ABBAS, 2005), agindo principalmente como uma citocina efetora das respostas imunes e possui papel protetor no início da infecção (TORRICO et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992; ALIBERTI et al.,1996), pela ação sobre macrófagos, ativando-os para atividade microbicida (REED, 1995; GAZZINELLI et al., 1992). Outras substâncias como o TNF-α e fatores inespecíficos, como o LPS (lipopolissacarídeos), podem estar envolvidos no processo de ativação de macrófagos (ALCINA & FRESNO, 1987). Isto ocorre porque *T. cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, induzindo a produção de IL-12, que além de estimular a proliferação de linfócitos T, ativa as células NK a produzirem IFN-γ, cuja função é acionar os macrófagos para a atividade parasiticida (ALIBERTI et al., 1996; TRINCHIERI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000; GALVÃO DA SILVA et al., 2003).

Durante a infecção por *T.cruzi*, IFN-γ é capaz de inibir *in vitro* o seu desenvolvimento (PLATA et al., 1984) e *in vivo* é capaz de diminuir a parasitemia e prolongar a sobrevida de animais infectados (PLATA et al., 1987). O IFN-γ atua sobre macrófagos, acentuando a atividade microbicida dessas células mediante a estimulação da síntese do óxido nítrico (NO), importante molécula efetora antimicrobicida (GAZZINELLI et al., 1992; DOST et al., 2006). O IFN-γ medeia esses efeitos ativando a transcrição dos genes que codificam a enzima óxido nítrico sintetase (NOs) responsável pela geração da molécula de óxido nítrico (MILLER et al., 2002; BERGERON & OLIVIER, 2006).

O óxido nítrico está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, como a vasodilatação sanguínea, agregação plaquetária e neuro-transmissão (MONCADA et al., 1991; MONCADA & HIGGS, 2006). Tem importante papel no controle de muitas infecções, principalmente contra patógenos intracelulares incluindo *Leishmania major* (LIEW et al., 1991; EVANS et al., 1996*), T. gondii* (ADAMS et al., 1990) e *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992; JAMES, 1995), apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA & ZILBERSTEIN, 2002; AKAMINE et al., 2007; MARCACCINI et al., 2007). É gerado por uma família de isoenzimas expressas em uma grande variedade de células de mamíferos, por meio da catálise enzimática de aminoácido essencial L-arginina (MONCADA et al., 1991). A catálise enzimática da reação do aminoácido L-arginina e oxigênio, que resulta na formação de L-citrulina e óxido nítrico, é feita pela enzima NOs (MONCADA & HIGGS, 1995). As formas de NOs diferem na sua localização celular e expressão: são elas: constitutiva, induzida e neuronal (QUEIROZ & BATISTA, 1999).

As NOs induzidas são enzimas que estão presentes em muitas células, principalmente em macrófagos ativados e produzem maiores quantidades de NO. Esta isoforma é predominante durante a inflamação e o controle da sua síntese acontece pela expressão do gene iNOS e depende de mediadores celulares presentes durante infecções e inflamação, como o IFN-γ, IL-2 (WONG & BILLIAR, 1995). Outras substâncias como o TNF-α e fatores inespecíficos, como o LPS (lipopolissacarídeos), também demonstraram estar envolvidos no processo de produção de NO (ALCINA & FRESNO, 1987; WALSH et al., 2007). Já a síntese de NO pela enzima NO sintetase constitutiva (cNOS) possui dependência a um cofator adicional, a calmodulina. Na presença de elevada concentração de cálcio, a calmodulina liga-se a cNOS, ativando-a (QUEIROZ & BATISTA, 1999). O óxido nítrico formado por esta via participa de muitos processos homeostáticos (WANG et al., 2007). Uma terceira isoforma das enzimas que geram óxido nítrico foi descrita e está expressa em neurônios, a NO sintetase neuronal (QUEIROZ & BATISTA, 1999); e sua liberação também depende da concentração intracelular de Cálcio/Calmodulina. A atividade dessas enzimas pode ser inibida por citocinas como a IL-4 e IL-10 (NATHAN, 1992).

Desde os estudos preliminares de TALIAFERRO & PIZZI (1995) a participação dos macrófagos como agentes de primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecida. Juntamente com as células T e as citocinas, desempenham função importante no controle da infecção chagásica (PADILLA et al., 2007;

DOSREIS et al., 2005; COSTA et al., 2006). Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito. Este último demonstrou-se altamente citotóxico contra as formas epimastigotas do parasita (THOMSON et al., 1999). O óxido nítrico é considerado também, como uma importante molécula efetora antimicrobicida em macrófagos contra patógenos intracelulares como *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992). Mas mesmo exercendo um papel crucial na função efetora no controle da resposta imune do hospedeiro, os macrófagos representam provavelmente, uma das primeiras células envolvidas na infecção chagásica, sendo capazes de abrigar o parasita e permitir sua multiplicação (SAVINO et al., 2007).

O controle da fase aguda da infecção está relacionado com a resposta celular, onde as células T exercem um efeito antiparasita precoce e anterior à produção de anticorpos (TRISCHMANN, 1984). Na fase aguda da infecção muitos neurônios periféricos são destruídos (KOBERLE, 1968), contribuindo para a patogenia da cardiopatia crônica, megaesôfago e megacólon (KOBERLE, 1968; OLIVEIRA, 1995; ROSSI & BESTETTI, 1995).

Alguns autores relatam que pesquisas desenvolvidas nos últimos anos permitem estabelecer: 1. a existência de mimetismo molecular entre o parasita e antígenos do hospedeiro; 2. o aparecimento, no decorrer da infecção, de auto-anticorpos que reconhecem epítopos cardíacos durante a fase crônica da doença; 3. que a transferência passiva de linfócitos provenientes de animais infectados em hóspedes singênicos, empregando células isoladas de linfonodos, baço ou linfócitos cultivados, produz lesões inflamatórias cardíacas e neurológicas; 4. a possibilidade de indução de lesões cardíacas e nervosas pela transferência de linfócitos de animais infectados para animais singênicos, virgens de infecção; 5. a elaboração de anticorpos contra antígenos miocárdicos, por linfócitos B dos infiltrados inflamatórios do coração; 6. que clones de linfócitos T, isolados a partir de biópsias cardíacas humanas, mostram reatividade com antígenos cardíacos (LAGUENS et al., 1999).

1.3 Hormônios Sexuais, Infecção e Resposta Imune

Além de desempenhar um importante papel na diferenciação sexual e na reprodução, os hormônios sexuais atuam em diversos mecanismos imunológicos (BOUMAN et al., 2005) e influenciam na suscetibilidade a doenças e infecções, especialmente infecções parasitárias (KLEIN, 2004; WHITACRE, 2001).

Há evidências clínicas e experimentais que suportam a idéia dos esteróides gonadais regularem a função imune (GROSSMAN, 1985). Tal conclusão é baseada: 1) na existência de dimorfismo sexual na resposta imune; 2) no fato da gonadectomia bem como a reposição de hormônios esteróides alterarem a resposta imune; 3) na presença de receptores específicos para hormônios esteróides nos órgãos e células responsáveis pela resposta imune; como por exemplo: linfócitos T expressam receptores para estrógenos e macrófagos receptores para dehidroepiandrosterona (DHEA) e testosterona (BENTEN et al., 2004).

Os hormônios sexuais podem influenciar profundamente as células da resposta imune inata, como os mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e NK (ROBERTS et al., 2001). Essas células, além de formarem a primeira linha de defesa contra muitos microrganismos, possuem importante papel no direcionamento e desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

A resposta imune adaptativa envolve, por exemplo, as células T e B e também é afetada diretamente pelos esteróides gonadais (SEIKI & SAKABE, 1997; SILVER & BRANCH, 1997; DA SILVA, 1999). EIDINGER & GARRET (1972) relataram um nível mais elevado de imunoglobulinas IgM e IgG nas fêmeas do que nos machos. Essa diferente resposta imunológica frente a estímulos é encontrada em várias espécies mamíferas, incluindo o homem. *In vitro*, foi mostrado que os estrogênios, em concentrações fisiológicas, induzem a ativação policlonal dos linfócitos B, aumentando os níveis de IgG e IgM (WEETMAN et al., 1981; KANDA & TAMAKI, 1999), enquanto a testosterona não causou nenhuma alteração no processo de maturação dessas células (KANDA et al., 1996).

Segundo MCMURRAY et al. (2001), os hormônios gonadais exercem efeitos distintos e cruciais sobre os órgãos linfóides e atuam tanto na proliferação quanto na apoptose celular, mediante a interação com mediadores como as citocinas (TANRIVERDI et al., 2003; CUTOLO et al., 2004).

WEINSTEIN et al. (1984) e FAAS et al. (2000) observaram que a porcentagem de linfócitos T nos machos é menor quando comparada com a porcentagem das fêmeas, e que essa diferença ocorre porque o estradiol (E2) tem ação estimuladora sobre a resposta proliferativa de células T, ao contrário da testosterona que, em concentrações mais elevadas, apresenta atividade imunossupressora sobre os linfócitos (PAGE et al., 2006).

Os hormônios sexuais, como testosterona e estrogênios possuem receptores específicos em linfócitos T CD4+ e T CD8+. Como mencionado anteriormente, a produção de

citocinas também é afetada pelos hormônios sexuais. O estradiol, por exemplo, possui habilidade de promover a produção de IFN-γ por células T CD4+ ativadas, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Este fato explica níveis aumentados dessa citocina nas fêmeas, quando comparadas aos machos (GOURDY et al., 2005). Segundo BOUMAN et al. (2005), a influência do dimorfismo sexual sobre a resposta imune é evidente, as fêmeas produzem resposta celular e humoral mais vigorosas do que os machos; são mais resistentes a certas infecções como as causadas por bactérias e parasitas, por exemplo (SCHUSTER & SCHAUB, 2001). Sofrem, porém, maior incidência de doenças auto-imunes, quando comparadas aos machos, apresentando doenças como lupus eritrematoso e artrite reumatóide (GROSSMAN, 1985).

Tanto a gonadectomia quanto a reposição de hormônios sexuais desencadeia uma resposta imune característica dependendo da situação fisiológica. A resposta imune em fêmeas pode variar entre outros fatores com o ciclo estral e também com o tipo de parasita. Estrógenos potencializam a produção de imunoglobulinas, e o estradiol parece inibir a atividade das células T supressoras, aumentando assim a maturação de células B e conseqüentemente a produção de imunoglobulinas (GROSSMAN, 1985).

Em relação à doença de Chagas, estudos pioneiros de DO PRADO et al. (1998; 1999) relataram a importância dos hormônios esteróides na evolução da doença experimental e demonstraram distintas alterações fisiológicas quando submeteram *Calomys callosus* à ovariectomia e orquiectomia provocando nestes animais modificações na resposta imunológica a *T.cruzi*. A ovariectomia levou os animais a uma maior susceptibilidade à infecção enquanto que a orquiectomia proporcionou maior resistência à infecção.

Todos esses dados apontam a influência marcante do dimorfismo sexual na resposta imune, o que torna seu estudo extremamente importante, principalmente no que se refere à doença de Chagas.

1.4 Glândula Pineal

A glândula pineal ou epífise, até o final da década de 50, era considerada um órgão vestigial, sem nenhum papel fisiológico definido. Com o isolamento da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MLT), em 1958 por LENER et al., ocasionou intensificação no interesse por estudos relativos à pineal e a seu principal produto. A glândula pineal vem sendo, ao longo dos séculos, fonte de múltiplas especulações, por vezes místicas, ora científicas. Ela é considerada o terceiro olho pelos hindus e teve sua anatomia descrita no século II por Galeno.

No século XVII, Descartes chocou os teólogos, atribuindo à pineal a sede da espiritualidade, acreditando que a alma humana ali se instalasse. Apesar de ser a primeira glândula a se formar, sendo no homem, identificada já na terceira semana após concepção, é a última a ter segredos desvendados, após sofrer extensas modificações durante sua evolução (MOORE, 1990).

A glândula pineal produz várias substâncias biologicamente ativas, entre elas, aminas (noradrenalina, histamina, melatonina, serotonina, dopamina, e octamiona), pequenas quantidades de alguns peptídeos como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e um análogo da ocitocina. Parece também produzir o neurotrasmissor inibitório, o ácido gama aminobutírico (GABA) (LEWY, 1983).

Mesmo no início do desenvolvimento filogenético, a pineal está intimamente conectada ao sistema nervoso central por neurônios sensitivos, mas nos mamíferos esta ligação direta deu lugar a fibras simpáticas pós-ganglionares provenientes do gânglio cervical superior. As fibras pré-ganglionares se originam nas células da coluna lateral da medula espinhal. Essas fibras simpáticas são reguladas por impulsos nervosos descendentes e emergentes dos núcleos supraquiasmático e paraventricular localizados no hipotálamo. O núcleo supraquiasmático recebe fibras diretamente da retina, através do trato retinohipotalâmico, que transmite informações sobre a luminosidade independentemente do estado de percepção da consciência. É mediante este intrincado complexo de conexões nervosas que a luz regula a atividade da pineal (KAPPERS et al., 1974).

Além de possuir conexões nervosas com a retina, a pineal também apresenta ligação com o hipotálamo e o gânglio cervical superior. Sua estrutura histológica sugere funções neuro-secretoras, porém contém ainda células glias e terminações nervosas. De fato, em vertebrados inferiores, como peixes e anfíbios, as células da pineal têm função semelhante ao olho, ou seja, são extremamente fotossensíveis; nos vertebrados superiores, todos os vestígios desta função foto-receptora desapareceram (REICHLIN, 1992). O parênquima da pineal é constituído por células epitelióides chamadas pinealócitos, com citoplasma levemente basófilo e contendo vesículas lipídicas. Os pinealócitos possuem de três a cinco terminações que, em sua maioria, alcançam capilares. Seu principal produto é a melatonina, que é liberada, assim que produzida (BLOOM & FAWCETT, 1986).

A inervação é fundamental para o funcionamento da glândula. Consiste de fibras noradrenérgicas originadas no gânglio simpático cervical e finalizadas nos espaços intersticiais ou nas membranas celulares dos pinealócitos. O endotélio da pineal é fenestrado e

permite a entrada e saída de grandes moléculas para o interior do espaço intersticial, diferindo assim do restante do sistema nervoso central, pela completa ausência de barreira hemato-encefálica. Todas as funções neuro-endócrinas desta glândula são mediadas por receptores β-adrenérgicos (KLEIN, 1978). Em roedores, a glândula pineal é dividida em uma porção superficial localizada dorsalmente ao mesencéfalo, com forma discretamente alongada e que pode ser retirada por meio de pinealectomia (HOFFMAN & REITER, 1965).

Duas características fazem da pineal uma glândula única, uma delas é a sua capacidade de sintetizar melatonina de forma rítmica, em um período de 24h e em quantidades consideráveis; a outra é a sua relação com as vias e estruturas nervosas, que participam da transmissão da informação fótica.

Um ponto interessante e único na fisiologia da glândula pineal é a relação existente entre a periodicidade do ciclo luz/escuro e a secreção de indóis pela mesma. Isso se observa quando há um prolongamento do fotoperíodo, onde a iluminação contínua provoca a redução na produção e secreção de melatonina. Este efeito fótico só ocorre, quando a via nervosa que conecta a retina e a pineal está intacta. Existem várias evidências da comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino. A glândula pineal é um importante elo destes sistemas, e estudos recentes têm mostrado a ação da melatonina sobre a resposta imune, frente a diferentes infecções parasitárias (REYES, 1993; SANTELLO et al. 2007, SANTELLO et al., 2008a; SANTELLO et al., 2008b).

1.5 Melatonina

A melatonina (MLT), ou seja, a N-acetil-5-metoxitriptamina é um derivado do aminoácido essencial triptofano. Ela foi isolada, primeiramente, a partir da glândula pineal de bovinos e estruturalmente identificada em 1958 (LENER et al., 1958); e foi por muito tempo tratada exclusivamente como um hormônio. Recentemente, acumularam-se evidências que têm mudado este conceito, evidenciando-a como um neurohormônio sintetizado pela glândula pineal durante a noite em todas as espécies, incluindo humanos (DELAGRANGE et al., 2003).

A sua síntese inicia-se a partir do triptofano e envolve várias enzimas e compostos indol. A etapa limitante para a síntese de melatonina é a atividade das enzimas N-acetiltransferase e a hidroxindol-orto-metiltransferase (HIOMT). Supõe-se que cerca de 25% da secreção de melatonina seja de origem extra-pineal, sendo impreciso o local de sua produção ectópica (LEWY, 1983).

A produção de melatonina é maior durante a noite, sendo sua concentração, no interior da pineal, inversa à de seu precursor, a serotonina. Durante o dia, os níveis de melatonina são muito baixos, começam a aumentar no início da noite e alcançam seu pico máximo no meio da noite, entre 2 e 4h da manhã, caindo a seguir, independente do estado de vigília (REICHLIN, 1992). Após atingir a circulação é rapidamente metabolizada no fígado e sua excreção se faz por via urinária, através do metabólito sulfato 6-OH-melatonina e depende de vários fatores como o sono, a dieta, a postura e a atividade física (KLEIN, 1978).

A maneira pela qual a melatonina chega à hipófise e ao hipotálamo é ainda obscura. Supõe-se que a drenagem da secreção se faça pela circulação venosa periférica, uma vez que não há uma via de condução direta da pineal ao terceiro ventrículo. Além disso, a pineal acha-se envolta por uma cápsula bastante espessa, o que impediria o escoamento de secreções através do espaço subaracnóideo (KAPPERS et al., 1974).

A diversidade dos receptores e suas diferentes distribuições, cerebral e em órgãos extracerebrais sugerem múltiplas atividades funcionais**.** Já foram descritos distintos receptores de membrana para melatonina: ML 1, com alta afinidade, e ML 2, com baixa afinidade (MORGAN et al., 1994; DUBOCOVICH, 1995). Duas formas dos receptores ML 1 foram identificadas em humanos; ML 1a (ou MT1) na hipófise e no núcleo supraquiasmático, provavelmente relacionando-se com os efeitos reprodutivos e circadiano (REPPERT et al, 1994); enquanto o ML 1b (ou MT2) é expresso na retina e em outras regiões do cérebro (VON GALL, 2002). Os receptores de melatonina estão ligados a duas classes diferentes de proteínas, o que lhes confere complexidade e explica tantas funções fisiológicas deste neurohormônio ao longo de todo o organismo. As funções dos receptores são recentes e novas descobertas podem trazer outras funções para estes receptores (DELAGRANGE et al., 2003, WITT-ENDERBY et al, 2003).

Além disso, já foram descritos receptores de melatonina em outros locais do organismo: gônadas e nas células ovarianas (YIE et al., 1995); olhos, baço e supra-renal (DUBOCOVICH, 1985; DUBOCOVICH & TAKAHASHI, 1987; NILES, 1989; LOPEZ-GONZALEZ et al., 1991; PANG et al., 1991; PERSENGIEV et al., 1991; YU et al., 1991).

Várias características da melatonina a distinguem de um hormônio clássico, como, por exemplo, sua atividade direta, não mediada por receptor, como radical livre (TAN et al., 2003). A melatonina é um componente indólico de relevância altamente biológica. Este produto da secreção pineal controla várias funções fisiológicas essenciais associadas aos ritmos circadiano e sazonal (REITER, 1991).

Por ser um mensageiro endógeno da escuridão, sua síntese endógena depende do fotoperíodo e mostra variações sazonais. O ritmo endógeno de secreção é gerenciado pelo núcleo supraquiasmático e controlado pelo ciclo claro/escuro. A melatonina pode ser considerada o ponteiro do relógio biológico (MAESTRONI, 2001; TAN, 2003).

Em humanos, os níveis de melatonina diminuem intensamente com a idade. As concentrações plasmáticas noturnas situam-se em torno de 250pg/ml em crianças de 1 a 3 anos, atingindo 120pg/ml na adolescência e declinando para 20pg/ml entre 50 e 70 anos de idade. Os níveis diurnos de melatonina são idênticos em todas as idades, ou seja, ao redor de 4 a 10 pg/ml (CAVALLO, 1991).

A melatonina possui, na espécie humana, várias ações fisiológicas ainda pouco definidas. Supõe-se que: 1) atue como antioxidante poderoso (REITER et al., 1995; EL-SHENAWY et al., 2002; GULCIN et al., 2002); 2) tenha ações imuno-estimulantes (MAESTRONI et al., 1988); 3) module respostas imuno-estimulantes na prevenção de várias neoplasias, como as de mama, próstata, estômago, pulmão e fígado (BLASK & HILL, 1986); 4) possua propriedades redutoras de colesterol; 5) ainda em base muito empírica, teria um efeito “antienvelhecimento” (REITER & ROBINSON, 1996). No entanto, a única função extragonadal atualmente comprovada no homem é a sua capacidade de induzir o sono (ZHDANOVA et al., 1995, CAJOCHEN et al., 2003).

Embora, em humanos, haja um aumento acentuado dos níveis de melatonina durante o período noturno (JIMERSON et al., 1977; WETTERBURG et al., 1976). WEINBERG et al. (1979) observaram que a melatonina é secretada durante todo o dia, marcadamente em períodos de vigília e na presença de luz. Tais observações levaram vários investigadores a proporem que a regulação da melatonina no homem seria substancialmente diferente daquela de outros mamíferos, atribuindo que esta fuga do controle ambiental conferiria ao homem considerável vantagem evolutiva (PERLOW et al., 1980).

Entretanto, nas duas últimas décadas, a polêmica se instalou de maneira contundente, pois várias publicações procuraram demonstrar que haveria um ritmo circadiano e ultracircadiano da luz sobre a secreção de melatonina em humanos (WEBLEY & LEIDENBERGER, 1986). No entanto, ao que parece, a intensidade luminosa deveria ser muito grande para que se obtivesse esse efeito. No rato, 500 lux de intensidade luminosa é bem mais do que o necessário para se conseguir a inibição da síntese de melatonina. Já na espécie humana este valor se situa entre 1500 e 2500 lux (LEWY et al., 1980).

1.6 Melatonina e o Sistema Imune

Os efeitos exercidos pela melatonina nos parâmetros imunes são diferentes, e dependem de vários fatores, como dose, via de aplicação, espécie, sexo, idade, assim como estação do ano, ritmo circadiano das imunidades celular e humoral, função da glândula pineal, condições de estresse, acompanhamento do processo experimental, etc (SKWARLO, 2002).

A melatonina é benéfica tanto à resposta imune celular quanto à resposta humoral. Ela estimula a produção de citocinas: interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12). Também estimula a produção de células progenitoras de granulócitos, macrófagos, células NK e algumas células T-auxiliares (CD4+) (SRINIVASAN et al, 2005).

Em situações de pinealectomia, ou naquelas de inibição da produção de melatonina, verifica-se um estado de imunosupressão, que desaparece quando os pacientes são tratados com aquele hormônio. Sua ação sobre o sistema imune ocorre através de linfócitos T-auxiliares, linfocinas e também se observa, através de certos hormônios pituitários. Por outro lado, linfocinas como IFN-γ e IL-2 podem, assim como o timo, modular a síntese de melatonina ao nível da glândula pineal (CUTANDO & SILVESTRE, 1995).

A melatonina age no sistema imune pela regulação da produção de citocinas de células imunocompetentes. O hormônio aumenta a produção de IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-12 em culturas de células mononucleares humanas. O aumento na produção de IL-12 está relacionado à ação da MLT sobre monócitos. A estimulação repetitiva de células T auxiliares (Th) na presença de IL-12 causa a diferenciação das células Th em células Th1, as quais produzem IL-2 e IFN-γ, citocinas estas que são efetivas no aumento da resposta imune que envolve macrófagos e outras células fagocitárias. As células NK também apresentam maior eficácia em sua atividade pelo aumento na produção de IL-2 e IL-12 (MORREY et al, 1994; GARCIA-MAURINO et al., 1999; LISSONI et al., 1998; BARJAVEL et al., 1998).

A MLT pode agir em receptores específicos de membrana, expressos em células imunocompetentes com receptores MT2 (existem dois tipos de receptores de melatonina, MT1 (REPPERT et al., 1994) e MT2 (REPPERT et al., 1995) e foi descrito um terceiro, MT3 (NOSJEAN et al., 2000), que aparentemente desempenham um papel maior quando se refere à ação sobre o sistema imune (CARRILLO-VICO et al., 2003; DRAZEN & NELSON, 2001; MAESTRONI, 1999). Receptores nucleares foram descritos em linfócitos (RAFII-EL-IDRISSI et al., 1998; SMIRNOV, 2001).

A MLT pode estimular a resposta imune e corrigir imunodeficiências secundárias resultantes do estresse agudo, de doenças virais, ou causadas por tratamentos medicamentosos. A ligação da melatonina a seus receptores específicos resulta na regulação positiva da produção de citocinas e da função imune (MAESTRONI, 1998).

Fisiologicamente, o pico noturno de MLT tem sido associado a uma relação IFN-γ/ IL-10 alta, isto é, o ritmo da MLT correlaciona-se positivamente a proporção entre células Th1/ células Th2 (CARRILLO-VICO et al., 2004; RAFII-EL-IDRISSI et al., 1998).

Estudos mostraram os efeitos imunomoduladores da melatonina administrada por via oral em ratos, que resultaram em aumento da atividade proliferativa de linfócitos e da taxa de síntese de DNA em linfócitos tímicos e esplênicos (EL-SOKKARY et al., 2003). Também foram realizadas pesquisas em ratos portadores de tumor, e estas revelaram um aumento tanto na proliferação linfocítica, como na habilidade regulatória da produção de citocinas por macrófagos, após tratamento com melatonina (MARTINS et al., 1998).

O efeito significativo da melatonina sobre o sistema imune tem sido demonstrado pela abundância de estudos *in vivo* e *in vitro,* que sugerem que a administração de melatonina pode influenciar nas respostas humoral e celular, assim como na proliferação celular e produção de mediadores. As ações da melatonina têm sido relacionadas com várias patologias – incluindo infecções, inflamação e auto-imunidade e esta relação vem sendo aos poucos elucidada em recentes achados (CARRILLO-VICO et al, 2005; SANTELLO et al, 2007; SANTELLO et al., 2008a e 2008b).

Tendo em vista a necessidade de novos estudos direcionados à análise de fatores que possam influenciar no desenvolvimento da doença de Chagas experimental, esse trabalho analisou de forma inédita e pioneira, a concomitância de fatores, ou seja, a ausência de hormônios sexuais masculinos endógenos e a ação sinérgica da administração de um hormônio exógeno como a melatonina, tendo em vista a não disponibilidade de trabalhos que relatem a ação da melatonina sobre o sistema imune nos casos de orquiectomia em animais infectados com *T.cruzi*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos imunomodulatórios da administração da melatonina e a ação dos hormônios sexuais masculinos, durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, em ratos *Wistar* machos orquiectomizados ou não, infectados com a cepa Y, através dos seguintes parâmetros:

⇒ peso dos animais, peso dos órgãos (coração, baço, timo), quantificação de parasitas sangüíneos (parasitemia) e teciduais (histologia do coração) e taxa de mortalidade;

⇒ contagem de leucócitos totais, macrófagos, dosagem de óxido nítrico (NO), linfoproliferação de timócitos e esplenócitos; e análise por citometria de fluxo das populações celulares T $CD3^+$ $CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$;

⇒ dosagem das citocinas: TGF-β1, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12, utilizando-se a técnica de ELISA.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Infecção com *T. cruzi*

3.1.1. Animais utilizados

Utilizamos ratos machos linhagem *Wistar*, jovens, pesando entre 100 e 120 gramas, provenientes de uma colônia mantida nos biotérios da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^{\circ}C$, com acesso livre a água e ração, acondicionados em número de 5 por caixa plástica, em ciclo claro/escuro 12/12 horas.

A escolha de ratos deveu-se à eficiência da resposta imune apresentada por este modelo experimental à infecção por *T. cruzi*. Utilizaram-se ratos jovens, pois à medida que envelhecem, tornam-se mais resistentes, mudando o padrão da curva parasitêmica podendo ser a mesma inaparente ou apresentar baixo número de tripomastigotas, algumas vezes indetectáveis através dos métodos usuais de contagem de parasitas.

Este trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (CEUA) protocolo 06.1.641.53.4.

Os grupos foram divididos em:

Grupo Controle

C - sem suplementação de melatonina, não infectados (n = 5);

I - sem suplementação de melatonina, infectados (n = 5);

CM - com suplementação de melatonina, não infectados (n = 5);

IM - com suplementação de melatonina, infectados (n = 5);

Grupo Sham

CSH - “sham”, sem suplementação de melatonina, não infectados (n = 5);

ISH - “sham”, sem suplementação de melatonina, infectados (n = 5);

CSHM – “sham”, com suplementação de melatonina, não infectados (n = 5);

ISHM – “sham”, com suplementação de melatonina, infectados (n = 5);

Grupo Orquiectomizado

COR - orquiectomizados, sem suplementação de melatonina, não infectados (n = 5);

IOR - orquiectomizados, sem suplementação de melatonina, infectados (n = 5);

CORM - orquiectomizados, com suplementação de melatonina, não infectados (n = 5);

IORM - orquiectomizados, com suplementação de melatonina, infectados (n = 5).

Tabela 1 - Grupos experimentais.

Dias de experimento após infecção	**7°**	**14°**	**21°**
Grupos			
C	5	5	5
I	5	5	5
CM	5	5	5
IM	5	5	5
CSH	5	5	5
ISH	5	5	5
CSHM	5	5	5
ISHM	5	5	5
COR	5	5	5
IOR	5	5	5
CORM	5	5	5
IORM	5	5	5

3.1.2 Orquiectomia

Os animais foram previamente anestesiados com tribromoetanol e, a seguir foram submetidos à orquiectomia, onde os testículos foram retirados e a bolsa escrotal suturada; outro grupo, convencionado “sham”, passou apenas por uma simulação cirúrgica, tendo sua bolsa escrotal aberta e em seguida suturada, sem a remoção dos testículos, simulando a cirurgia. Já o grupo controle não passou por qualquer tipo de cirurgia. Após a cirurgia, os animais receberam o antibiótico Amoxicilina 250mg/5mL, por via oral, adicionada à água dos bebedouros, por 7 dias. Aguardou-se 30 dias até a realização do inóculo infectante, para observar se haveria a ocorrências de infecção ou morte devido ao procedimento cirúrgico.

3.1.3 Dias de Experimento

Os experimentos foram realizados nos dias pré-determinados: 7°, 14° e 21° após o inóculo infectante. Estes dias foram escolhidos de acordo com o perfil da curva parasitêmica, onde o pico de parasitemia ocorre, normalmente, entre o 7º e 14º dias, após o inóculo (BRAND et al, 1949).

3.1.4 Cepa de *T.cruzi*

Foi utilizado o inóculo de 1 x 10^5 formas da cepa Y, via intraperitonial. Utilizamos 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, esta cepa vem sendo mantida em camundongos S*wiss* não isogênicos, através de repiques semanais de sangue infectado. A cepa Y possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoce, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves e seu estudo está bem preconizado em diferentes modelos experimentais, inclusive em ratos (UYEMURA et al, 1995; SCORZA & SCORZA, 1972).

3.2 Administração da melatonina

A melatonina (M5250 – SIGMA- ALDRICH, 113K0973, St Louis, USA) foi administrada na dose de 5mg/kg, por via oral, diluída em água (5% p/v) e nos grupos controle somente se utilizou veículo, seguindo os padrões utilizados em estudos prévios, como em doença auto-imune e na própria doença de Chagas (KANG et al, 2001, SANTELLO et al, 2007). O tratamento ocorreu pela manhã, pois neste período, os níveis plasmáticos de melatonina apresentam-se baixos.

3.3 Pesagem dos animais e órgãos

Previamente à eutanásia, os animais foram pesados em balança eletrônica Mettler. Imediatamente após a abertura da cavidade abdominal, os órgãos (coração, timo e baço) foram imediatamente pesados em todos os dias de experimento. Os resultados foram expressos em gramas (g).

3.4 Eutanásia dos animais

Os animais foram primeiramente anestesiados com tribromoetanol a 2,5% e em seguida decapitados. O anestésico causou inconsciência em função de sobredosagem, provocando uma ausência de percepção das sensações, numa relação dose-efeito. A decapitação é um método rápido, eficaz e seguro. Todos esses procedimentos visaram um mínimo de dor, medo e angústia, além de evitar que outras manipulações aumentassem o efeito do estresse e desta maneira alterassem a resposta imunológica do animal (CALDEIRA & FRANCI, 2000; SANTOS et al, 2005).

3.5 Parasitemia

Decorridos 30 dias após a orquiectomia, os animais do grupo infectado foram inoculados intra-peritonialmente com $1x10^5$ tripomastigotas sanguícolas. A contagem dos parasitas foi feita pelo método de BRENER, que consiste em colocar uma alíquota de 5µL de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22 x 22mm. Determinou-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos, selecionados em várias áreas do preparado. O número encontrado foi multiplicado por um fator, calculado para cada microscópio e objetiva, que leva em consideração o número de campos microscópios existentes na área da lamínula (BRENER, 1962). Os resultados foram expressos em número de parasitas por mililitro de sangue total (Parasitas/mL).

3.6 Coleta de sangue

Após a morte dos animais foi coletado cerca de 2,0mL de sangue em um tubo plástico para a determinação da parasitemia. Para as análises imunológicas foram coletados 2,0mL de sangue em frasco sem anticoagulante para obtenção de soro.

3.7 Contagem global de leucócitos

A contagem global de leucócitos foi realizada através da coloração de 10µL de sangue total em 390µL de solução de Turk (solução de ácido acético a 3% diluído em água destilada, acrescida de violeta genciana) seguida de contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em número total de leucócitos por mililitro de sangue total (Leucócitos/mL).

3.8 Contagem de macrófagos peritoniais

Imediatamente após a morte dos animais, injetaram-se 10mL de meio RPMI estéril na cavidade peritonial. Foi realizada uma massagem abdominal suave e, em seguida, retirou-se o líquido peritonial. A contagem de macrófagos do líquido peritonial foi feita através da retirada de uma alíquota de 10µL do lavado peritonial que foi diluída em solução de Turk (990µL), para contagem das células viáveis (macrófagos) em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em número total de macrófagos peritoniais por milímetro cúbico (Macrófagos peritoniais/mm^3).

3.9 Quantificação de Óxido Nítrico

A determinação de óxido nítrico foi realizada pela produção de nitrito de células do lavado peritonial. Os ratos tiveram a cavidade peritonial lavada com 10mL de RPMI a 4ºC, que foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O sedimento foi ressuspendido com 1mL de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Dessa suspensão, retirou-se uma alíquota de 10µL que foi diluída em solução de Turk (990µL), para contagem das células viáveis (macrófagos). Depois de contadas em câmara de Neubauer, as concentrações foram acertadas para 5×10^5 cel/mL. Recolheram-se 100µL do sobrenadante, que foram transferidos para uma placa de 96 poços, em duplicata, contendo 5×10^5 cel/poço, onde nos poços controle, adicionaram-se 100µL de LPS a uma concentração de 5µg/mL, seguindo-se uma incubação em estufa contendo 5% de CO_2, durante 24 horas a 37ºC. Após este período, submeteu-se a placa à centrifugação à 1500rpm durante 4 minutos. Recolheram-se 100µL do sobrenadante, que foram transferidos para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Griess (sulfanilamida 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% + alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% (v/v) em água) (GREEN et al., 1982) permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas utilizando filtro de 540nm. A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando NO_3 com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al., 1995; HRUBY & BECK, 1997). A leitura da absorbância foi realizada em aparelho de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) (SALTZMAN, 1954).

3.10 Linfoproliferação de timócitos

O timo foi assepticamente removido, macerado e ressuspenso a uma concentração de $5x10^6$/mL em RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Paisley, UK), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL), L-glutamina (2mM), e 2-mercaptoetanol (0,05mM) em placas de 96 poços. As células foram cultivadas em triplicatas e estimuladas com concanavalina A (Con A: 4µg/mL), diluídas no mesmo meio. A proliferação de timócitos foi quantificada depois de 48 horas pela adição de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A leitura da absorbância foi realizada em 570nm utilizando aparelho de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) (SALTZMAN, 1954).

3.11 Linfoproliferação de esplenócitos

O baço foi assepticamente removido, macerado e ressuspenso a uma concentração de $5x10^6$/mL em RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Paisley, UK), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL), L-glutamina (2mM), e 2-mercaptoetanol (0,05mM) em placas de 96 poços. As células foram cultivadas em triplicatas e estimuladas com concanavalina A (Con A: 4µg/mL), diluídas no mesmo meio. A proliferação de esplenócitos foi quantificada depois de 48 horas pela adição de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A leitura da absorbância foi realizada em 570nm utilizando aparelho de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) (SALTZMAN, 1954).

3.12 Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de fluxo

A citometria de fluxo permite a análise de diferentes parâmetros: tamanho, granulosidade e fluorescência. Um sistema óptico-eletrônico permite a detecção destas características, através da avaliação da dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência. Para realização desta análise foram utilizadas células esplênicas, obtidas do baço, que foi removido cirurgicamente; os esplenócitos foram obtidos por maceração do mesmo em peneiras de aço inox com porosidade em 4mL de meio de RPMI 1640 (GibcoBR). Em seguida, as células foram lavadas por 15 minutos a 10°C, ressuspensas em 10mL de RPMI. Os tubos permaneceram em repouso por alguns minutos para a formação

de matriz, que foi removida. Homogeneizaram-se cuidadosamente os tubos, coletando-se 10µL desta suspensão em 390µL de solução de Turk e procedendo-se a contagem de células em câmara de Neubauer. Após a contagem, a concentração foi acertada para 1 x 10^6 células/mL em tampão fosfato (PBS) contendo 1% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% de azida sódica (Tampão de FACS). Em seguida, alíquotas de 200µL de células foram colocadas nos poços em placas de 24 poços, fundo em U, centrifugadas por 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. O sedimento de células foi desfeito após agitação e as células incubadas com 30µL de Fc-block (soro de camundongo inativado em PBS, para evitar ligações inespecíficas), por 30 minutos a 4°C. Ao final da incubação, as células foram centrifugadas a 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com anti-CD3+PE, anti-CD4+FITC e anti-CD8+PERCP, diluídos em tampão de FACS (1:30), incubadas por 30 minutos a 4°C, protegidas da luz. Após esta etapa, lavou-se a placa com 170µL de tampão de FACS, centrifugando-a a 2000rpm durante 15 segundos. Por último, ressuspenderam-se as células com 200µL de tampão de FACS e transferiu-as para os tubos de leitura contendo 300µL de tampão de FACS.

Foram utilizados no experimento os anticorpos monoclonais conjugados com PE (r-phicoeritrin), FITC (Fluorescein isotiocianate) e PERCP (Peridin Clorofil Protein) (BD-Pharmingen, CA, USA). A aquisição e análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo [FACScan -Becton Dickinson, Sunnyvale, CA] e software DIVA-BD.

3.13 Histologia do coração

Em cada dia de experimento, 5 (cinco) animais de cada grupo foram mortos. Durante a necropsia dos animais, o coração foi retirado e pesado em balança eletrônica (Mettler H10W), lavado em solução fisiológica 0,9%, fixado em formol 10% tamponado e, após 24h, mantido em álcool 80%, até sua inclusão em parafina. Antes da inclusão em parafina, o coração foi cortado transversalmente de maneira semi-seriada, com espessura de 6µm e, a seguir, foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE). A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70µm, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi* (CAMARGOS et al., 2000). Foram examinados 6 cortes de cada animal em microscópio óptico com aumento de 1000X (imersão) (MELO & BRENER, 1978).

3.14 Intensidade do parasitismo tecidual cardíaco

O grau de parasitismo tecidual foi analisado quantitativamente, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X), sendo considerados todos os ninhos encontrados em cada campo (CASTRO & BRENER, 1985). Para esta análise foram utilizados 5 (cinco) animais de cada grupo experimental.

3.15 Dosagens de Citocinas:

3.15.1 Dosagens de TGF-β1, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10

Cada anticorpo de captura das citocinas acima citadas foi diluído em 1mL de PBS suplementado com soro bovino fetal e, em seguida, foram diluídos novamente, no mesmo diluente mencionado anteriormente, objetivando acertar a concentração sugerida em cada protocolo da respectiva citocina (2µg/mL para TGF-β1, IFN-γ e IL-4 ; 4µg/mL para TNF-α, IL-10 e 1,6µg/mL para IL-2). Placas de poliestireno de alta afinidade de 96 poços, fundo plano (Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) foram sensibilizadas com 100µL de anticorpo de captura purificado específico para cada interleucina e incubadas, de 16 a 20h, à temperatura ambiente. Após a incubação lavou-se por três vezes a placa com tampão de lavagem (1L PBS + 0,5mL Tween 20) e bloqueou-se com 300µL/poço de tampão de diluição (10g BSA + 1L PBS) sendo incubadas por mais 1 hora em temperatura ambiente. Novamente lavou-se mais três vezes (neste processo, entre cada aplicação de tampão de lavagem, verte-se a placa e seca-a). Reconstituiu-se a recombinante padrão, com reagente diluente, para realização da curva, utilizando-se como ponto inicial da curva, as concentrações sugeridas em cada protocolo do fabricante (R&D systems) (2000pg/mL para TGF-β1, 2500pg/mL para IFN-γ, 2000pg/mL para TNF-α, IL-2, IL-10, 1000pg/mL para IL-4), procedendo-se diluição seriada de 1:1, onde o último ponto foi considerado branco (somente 100µL reagente diluente). Aplicou-se na placa a curva padrão e as amostras de soro em duplicata, utilizando o volume de 100µL/poço e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente (As amostras de soro da TGF-β1 foram ativadas antes da aplicação)*. Neste intervalo, preparou-se o anticorpo de detecção**, com reagente diluente, na concentração de trabalho (100ng/mL para IL-4 e TNF-α, 300ng/mL para IL-10 e TGF-β1, 150ng/mL para IFN-γ, 400ng/mL para IL-2). Lavou-se três vezes a placa e aplicaram-se 100µL/poço de anticorpo de detecção, incubando por mais 2 horas. Em seguida, cada placa foi lavada com tampão de lavagem, por mais três vezes. Aplicaram-se 100µL/poço de estreptoavidina-HRP (diluída (1:200 em reagente diluente) e incubou-se por 20 minutos a temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada

por três vezes, adicionando-se 100µL/poço de substrato (15mL de TMB (Tetrametilbenzidina) + 15mL H_2O_2) nos poços. Incubou-se por mais 20 minutos, sob abrigo da luz. Adicionou-se 50µL/poço de solução de H_2SO_4 2N, para interromper a reação, homogeneizou-se e realizou-se leitura à um comprimento de onda 450nm em leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant).

*Ativação das amostras de soro da interleucina TGF-β1: Adicionaram-se 0,1mL de Ácido Acético 2,5N/ Uréia 10M em 0,1mL de amostra, incubando-se a placa por 10 minutos em temperatura ambiente. Neutralizou-se com 0,1mL de NaOH 2,7N/HEPES 1M. Diluiu-se a mostra em 1:10 com reagente diluente, multiplicando-se posteriormente pelo fator de diluição 30.

** O Anticorpo de detecção para as interleucinas IL-10 e IL-2 foi adicionado em reagente diluente, preparado 2h antes do uso, com 2% de soro de cabra inativado.

3.15.2 Dosagem de IL-6

Para a dosagem de IL-6 utilizou-se o kit comercial R&D Systems – Quantikine Rat IL-6, seguindo-se as especificações do fabricante. Foram utilizadas placas de 96 poços já sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocinas para ratos. Adicionaram-se 50µL de reagente diluente em todos os poços. Foram preparadas as amostras, utilizando-se soro de rato diluído 1:1 (75µL de soro + 75µL de reagente diluente) e os tubos da curva padrão, através da reconstituição do padrão de IL-6 de rato diluído em 1mL reagente diluente; este tubo representou a concentração de 4000pg/mL. Pipetou-se 200µL de reagente diluente em sete tubos de ensaio e colocou-se no tubo 1, 200µL do padrão diluído inicialmente e procedeu-se uma série de diluições 1:1 até o tubo 7, no tubo 8 foi colocado apenas o reagente diluente (0pg/mL da curva). Em seguida, 50µL das amostras e padrões foram aplicados em seus respectivos poços. A placa foi agitada suavemente por 1 min, e coberta, deixando-a à temperatura ambiente por 2h. Após a incubação, cada placa foi lavada quatro vezes, com 400µL/poço de tampão de lavagem (diluído conforme instruções, em água destilada). Aplicou-se, então, 100µL de anticorpo conjugado anti-IL-6 biotinilado (diluído em 1mL de água destilada), em todos os poços, e incubou-se por 1h em temperatura ambiente. Após novo ciclo de quatro lavagens, foi adicionado substrato 100µL/poço, incubando novamente por 30 minutos, protegendo da luz, e a reação foi interrompida pela adição de 100µL de solução de ácido sulfúrico 2N (solução de parada). As densidades ópticas (D.O.) das placas foram lidas em leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) em um comprimento de onda de

450nm, os dados foram processados em programas de estatísticas e devidamente plotados e analisados.

3.15.3 Dosagem de IL-12

Para a dosagem de IL-12 utilizou-se o kit comercial BIOSOURCE, Califórnia, USA: BIOSOURCE Immunoassay Kit Rat IL-12, seguindo-se as especificações do fabricante. Foram utilizadas placas de 96 poços já sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocinas para ratos. Reconstituiu-se o anticorpo padrão para realização da curva e adicionaram-se 100µL/poço, em duplicata, diluído em tampão de diluição (8mM de azida sódica em 25mL de solução), procedendo-se diluição seriada na razão de 1:1, onde o último ponto foi considerado branco (ponto de partida inicial – concentração de 1000pg/mL e no branco foi colocado apenas reagente diluente). Nos outros poços, foram pipetados 100µL das amostras experimentais em duplicata na proporção de 1:5, em tampão de diluição. Adicionaram-se 50µL de tampão de incubação em todos os poços, com exceção do branco. Após esse processo, as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação, cada placa foi lavada quatro vezes, com 400µL/poço de tampão de lavagem (diluído conforme instruções, em água destilada). Adicionaram-se, então, 100µL de anticorpo biotinilado anti-IL-12, em todos os poços, com exceção do branco, e incubou-se por 1h em temperatura ambiente. Procedeu-se quatro lavagens, com 400µL/poço de tampão. A revelação enzimática foi feita pela adição de 100µL/poço estreptavidina-HPR (100 vezes concentrada, contendo 3,3mM de timol por frasco de 0,125mL) diluída 1:100 em diluente específico (contendo 3,3mM de timol por frasco de 25mL) e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Após novo ciclo de quatro lavagens, foi adicionado substrato revelador tetrametilbenzidina (TMB), 100µL/poço, incubando novamente por 30 minutos, ao abrigo da luz, e a reação foi interrompida pela a adição de 100µL de solução de ácido sulfúrico 2N (solução de parada). As densidades ópticas (D.O.) das placas foram lidas em leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) em um comprimento de onda de 450nm, os dados foram processados em programas de estatísticas e devidamente plotados e analisados.

3.16 Taxa de Mortalidade

Para a verificação da taxa de mortalidade dos animais em estudo durante todo período pós-infecção, inspecionou-se as gaiolas diariamente, contendo os animais dos grupos infectados tratados e não tratados com melatonina durante o decorrer dos experimentos.

3.17 Análise Estatística

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism versão 4.0. A significância estatística entre os grupos foi realizada pela análise de variância One-way ANOVA ($P<0.05$) e post-test de Bonferroni.

4- RESULTADOS

4.1. Peso Corpóreo

Tabela 2. Peso corpóreo de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com 1x 10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o pico de parasitemia (7º dia após o inoculo).

Grupos Experimentais	*Número de animais*	*Peso corpóreo dos animais (g)* *(Média / CV[1])*
C	05	505,5 / 15,2%
CM	05	514,3 / 11,1%
CSH	05	485,2 / 6,3%
CSHM	05	519,5 / 7,9%
COR	05	423,8 / 13,4%
CORM	05	409,7 / 12,3%
I	05	504,2 / 14,9%
IM	05	398,9 / 16,7%
ISH	05	502,4 / 5,6%
ISHM	05	491,1/ 10,8%
IOR	05	416,5 / 12,9%
IORM	05	406,2 / 11,8%

[1]*CV: Coeficiente de variação*

Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM), $p>0,05$.

Não houve alterações significativas no peso corpóreo dos animais em nenhum grupo experimental (Tabela 2). Por estes dados observa-se que a infecção não interfere no crescimento do modelo experimental utilizado.

4.2. Peso dos Órgãos

4.2.1. Peso do Coração

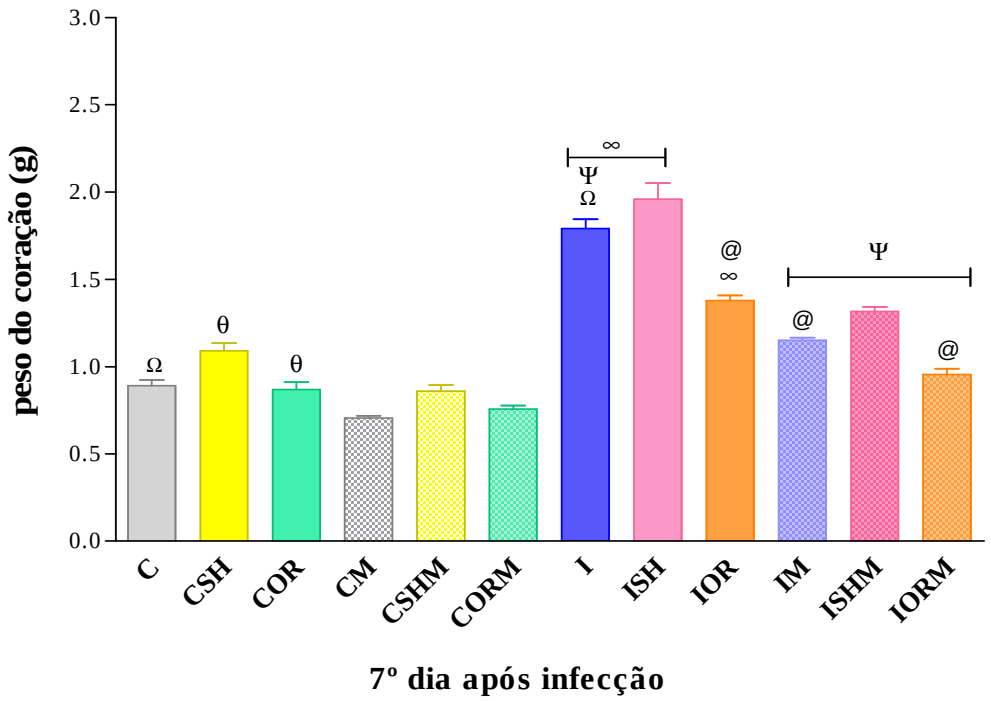


Figura 1. Peso do coração de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no o 7º dia após a infecção (pico da parasitemia), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

$p < 0,001$ $^{\Omega}$ I vs C; ISH vs CSH; IOR vs COR; ISHM vs ISH; CSHM vs ISHM; $^{\infty}$ IOR vs I, ISH; $^{\Psi}$ IM, ISHM, IORM vs I.

$p < 0,01$ $^{\theta}$ CSH vs COR

$p < 0,05$ $^{@}$ IORM vs IM, IOR

O peso cardíaco foi maior nos grupos infectados em relação aos grupos sem infecção. Entre os animais infectados, o grupo orquiectomizado apresentou peso cardíaco reduzido quando comparado aos grupos sham e controle, o que provavelmente está relacionado com a redução do número de parasitas circulantes nos animais orquiectomizados e com a redução dos níveis de testosterona, contribuindo para uma menor lesão ao músculo cardíaco por *T. cruzi*. Observou-se também uma diminuição do peso cardíaco nos animais infectados

submetidos à administração de melatonina quando comparados aos animais infectados e não tratados. O tratamento associado à orquiectomia (IORM) conferiu aos animais uma diminuição significante do peso cardíaco, provavelmente pela diminuição de ninhos de amastigotas, reduzido infiltrado inflamatório e menor comprometimento das fibras cardíacas em relação aos grupos infectado e orquiectomizado (IOR) e infectado e tratado com melatonina (IM), evidenciando um efeito somatório da orquiectomia e do tratamento com melatonina contra o parasita (Figura 1).

4.2.2 Peso do Baço

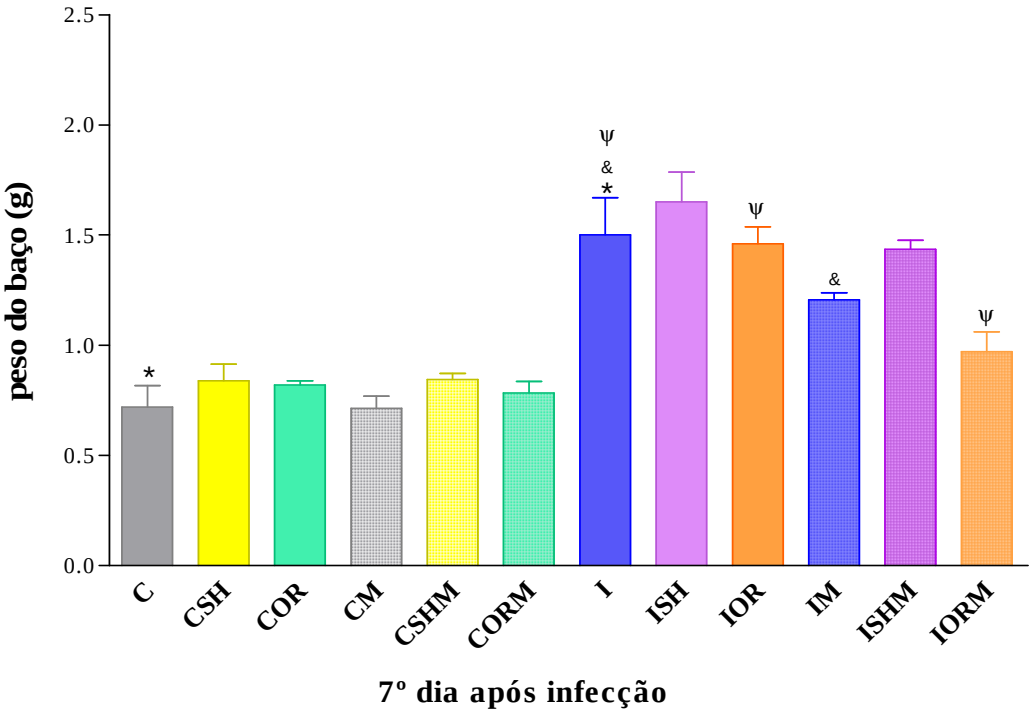


Figura 2. Peso do baço de ratos *Wistar* não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção (pico da parasitemia), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

$p < 0,001$ * C vs I; $^{\&}$ IM vs I; ISH vs CSH; ISHM vs CSHM; IOR vs COR

$p < 0,01$ $^{\Psi}$ IORM vs IOR, I; IM vs CM

Não houve diferença no peso do baço entre os animais controle tratados e não tratados. O peso esplênico sofreu aumento nos grupos infectados em relação aos grupos controles. Os grupos infectados tratados com melatonina apresentaram massa esplênica menor em relação aos não tratados, o que ilustra a proteção da melatonina contra a invasão do parasita aos órgãos-alvos. Também se observa diferença no grupo infectado orquiectomizado tratado com melatonina (IORM) em relação ao infectado (I) e infectado tratado com melatonina (IM), mostrando mais uma vez a ação sinérgica da melatonina e da orquiectomia sobre a resistência à infecção por *T. cruzi* (Figura 2).

4.2.3 Peso do Timo

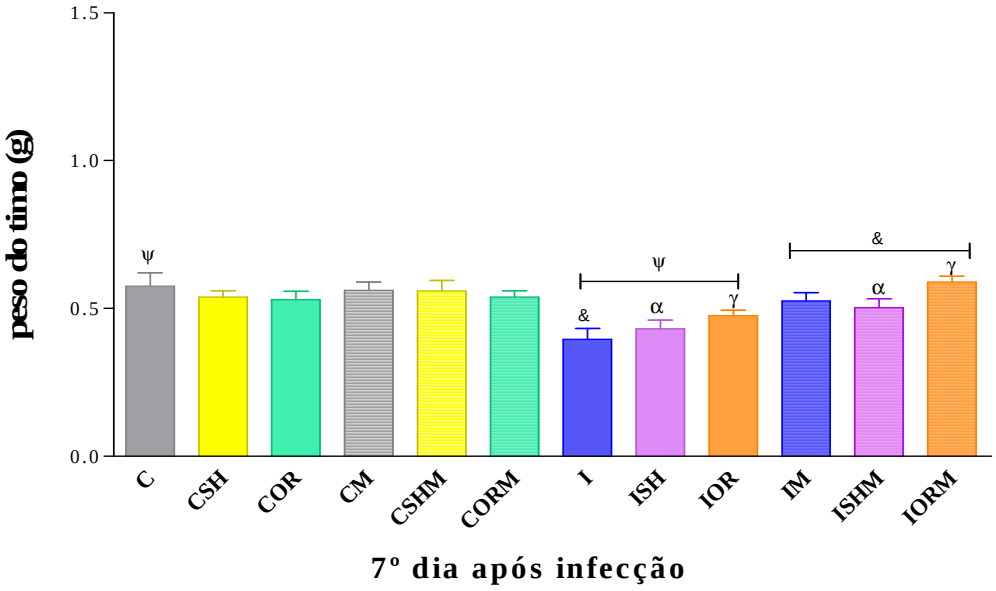


Figura 3. Peso do timo de ratos *Wistar* não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção (pico da parasitemia), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

$p < 0{,}001$ $^{\Psi}$ C vs I, ISH, IOR; $^{\gamma}$ IORM vs IOR

$p<0{,}01$ $^{\alpha}$ISHM vs ISH

$p<0{,}05$ $^{\&}$ I vs IM, ISHM, IORM

Não houve diferença significativa no peso do timo entre os animais controle tratados e não tratados. Os grupos infectados apresentaram massa tímica menor em relação aos grupos sem infecção. Os grupos infectados (I, ISH, IOR) apresentaram massa tímica menor em relação aos grupos infectados tratados com melatonina (IM, ISHM e IORM). A diferença mais significativa foi observada entre o grupo infectado (I) e o grupo infectado tratado e orquiectomizado (IORM). Observando estes dados, nota-se novamente o efeito positivo da melatonina e também o resultado da orquiectomia, atuando isolada ou sinergicamente nos grupos infectados e refletindo em uma ação direta sobre o parasita (Figura 3).

4.3 Parasitemia

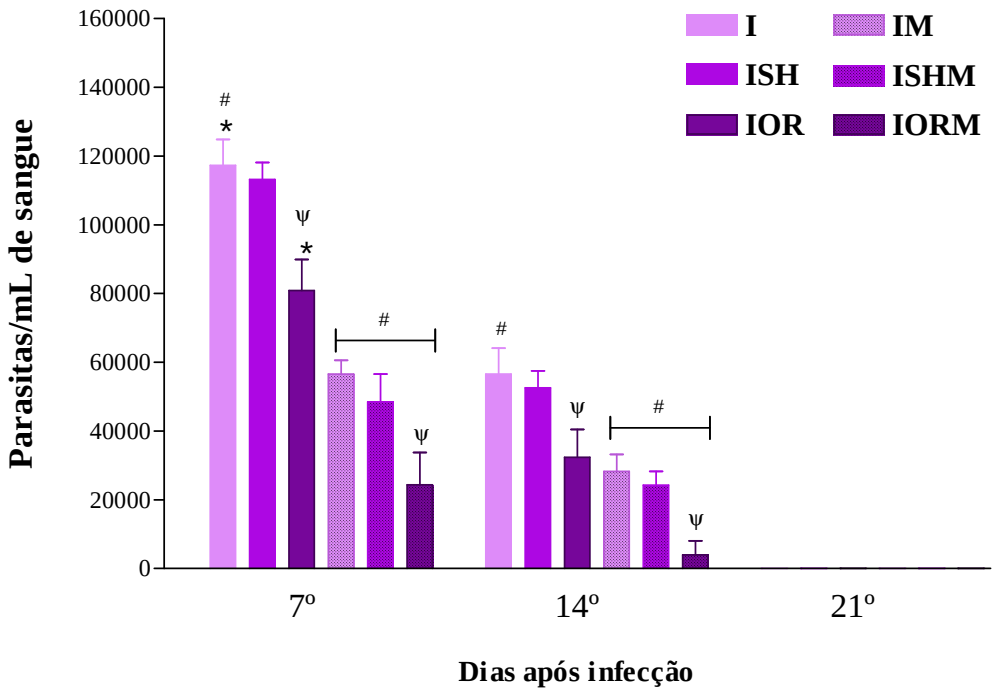


Figura 4. Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dia após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para todos os grupos de animais em cada dia de experimento n = 5.

$p < 0,05$

* IOR vs I (7° dia após infecção); ISH vs ISHM (14° dia após infecção)

$p < 0,001$:

IM, ISHM e IORM vs I; (7° e 14° dias após infecção); IM, ISHM e IORM vs ISH (7° dia após infecção)

Ψ IORM vs IOR (7° e 14° dias após infecção)

O pico parasitêmico ocorreu no 7° dia após o inóculo para todos os grupos. Os animais submetidos ao tratamento com melatonina apresentaram redução estatisticamente significativa em relação aos animais não tratados, principalmente quando se compara com o grupo infectado (I). Os grupos submetidos à orquiectomia apresentaram parasitemias mais baixas em relação aos grupos não submetidos à cirurgia e sham. Este perfil foi seguido nos grupos tratados e não tratados com melatonina, onde os grupos tratados apresentaram parasitemia ainda menor (Figura 4).

A administração de melatonina além de promover diminuição na parasitemia, também exerceu papel sinérgico à orquiectomia, tornando os animais mais resistentes à infecção apresentando menor número de parasitas sangüícolas.

4.4 Leucócitos totais

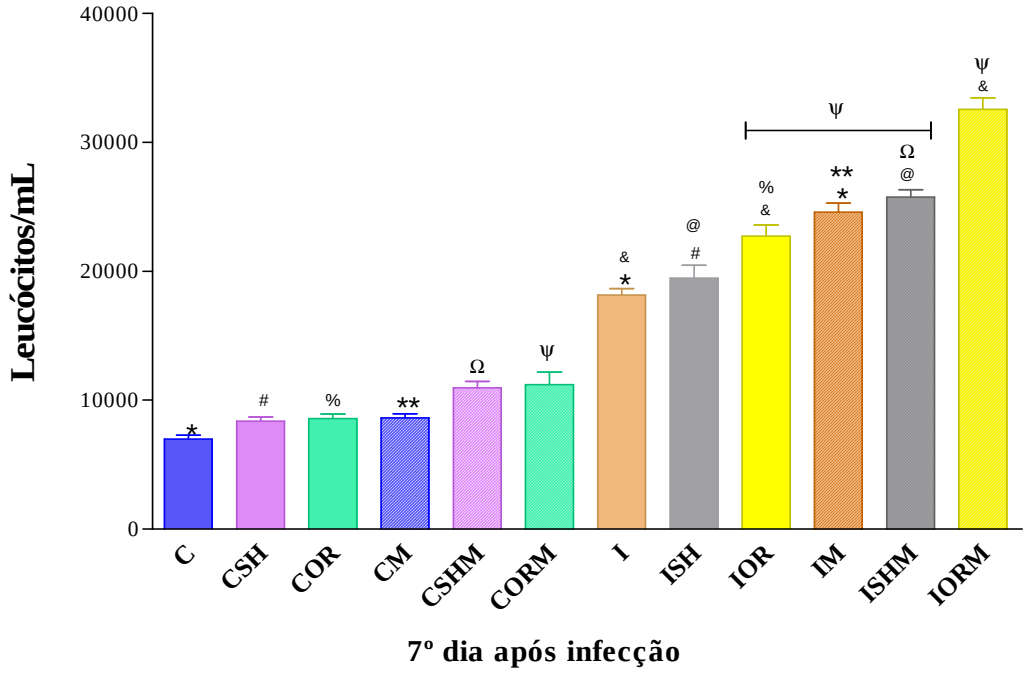


Figura 5. Número total de leucócitos de ratos *Wistar* não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção (pico da parasitemia), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

$p < 0,05$ * I vs C, IM

$p < 0,01$ ** CM vs IM; # CSH vs ISH; @ ISH vs ISHM

$p < 0,001$ & I vs IOR, IORM; Ω CSHM vs ISHM; % IOR vs COR; Ψ IORM vs IM, ISHM, CORM e IOR

Entre os grupos não infectados, o número total de leucócitos mostra discreto aumento nos grupos tratados com melatonina. Entre os grupos infectados, os animais tratados com melatonina apresentam um maior número de leucócitos em relação aos grupos não tratados, deixando clara a ação protetora da melatonina em resposta a *T. cruzi*. Já o grupo orquiectomizado infectado tratado com melatonina, revela valores estatisticamente significantes em relação aos grupos não tratados. O perfil leucocitário observado entre os grupos infectados é característico da evolução da doença de Chagas experimental (Figura 5).

4.5 Contagem global de macrófagos peritoneais

Tabela 3. Contagem global de macrófagos peritoniais em ratos *Wistar* machos controles (não infectados) e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dia após a infecção.

Grupos Experimentais (n=5)	***Macrófagos peritoneais/mm³ (Média ± DP[1])***		
	7º dia após a infecção	**14º dia após a infecção**	**21º dia após a infecção**
C	8950 ± 1215	8300 ± 475	7950 ± 382
CSH	7850 ± 458	6950 ± 1593	7250 ± 818
COR	12450 ± 852	11350 ± 1085	9850 ± 2208
CM	10250 ± 1065	11800 ± 2347	9650 ± 1485
CSHM	11200 ± 325	9650 ± 982	9450 ± 1370
CORM	12150 ± 704	11800 ± 654	11150 ± 1681
I	22500 ± 2646	19950 ± 4991	20550 ± 2192
ISH	20550 ± 662	18550 ± 1493	18300 ± 3321
IOR	31050 ± 4569 [#]	28250[#] ± 4602	20900 ± 5890
IM	26850 ± 4587 [###]	23600 ± 5472	22250 ± 2925
ISHM	24200 ± 3141	19300 ± 2764	19250 ± 1939
IORM	42300 ± 1362 [##]	29450 ± 2845	23850 ± 2515

[1]*DP: Desvio Padrão*

Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

[###] $p<0,001$ IM vs ISH (7º dia após a infecção)

[##] $p<0,01$ IORM vs I, ISH, IM e ISHM (7º dia após a infecção)

[#] $p<0,05$ IOR vs I e ISH (7º e 14º dias após a infecção)

Nos grupos sem infecção não foram observadas alterações significativas quanto ao número de macrófagos. Entre os animais infectados, o grupo orquiectomizado apresentou valores mais elevados do que os animais do grupo controle não infectado (C) e sham (CSH), no sétimo dia após a infecção (pico da parasitemia). A administração de melatonina exerceu papel sinérgico à orquiectomia, apresentando número de macrófagos estatisticamente mais elevado no grupo orquiectomizado e submetido ao tratamento com melatonina (IORM) (Tabela 3).

4.6 Dosagem de Óxido Nítrico

4.6.1 Grupos não infectados

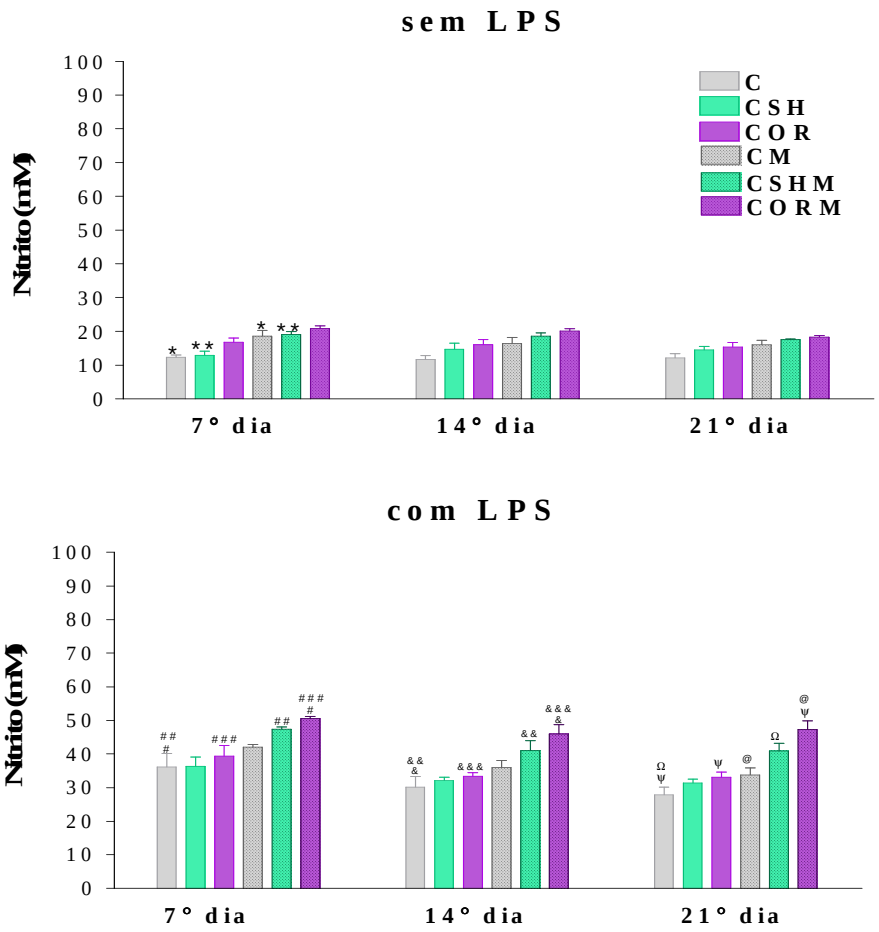


Figura 6. Concentração de NO (µM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS (10µg/mL), coletadas de ratos *Wistar* machos controles (não infectados) durante 7º, 14° e 21º dias, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Sem LPS 7° dia

$p < 0,01$ * C vs CM; $p < 0,05$ ** CSH vs CSHM

Com LPS 7° dia

$p < 0,01$ $^{\#}$ CORM vs C; $p < 0,05$ $^{\#\#}$ CSHM vs C; $^{\#\#\#}$ CORM vs COR

Com LPS 14° dia

$p < 0,01$ $^{\&}$ CORM vs C; $p < 0,05$ $^{\&\&}$ CSHM vs C; $^{\&\&\&}$ CORM vs COR

Com LPS 21° dia

$p < 0,001$ $^{\Psi}$ CORM vs C, COR; $p < 0,01$ $^{\Omega}$ CSHM vs C; $^{@}$ CORM vs CM

A administração de melatonina estimulou a produção de óxido nítrico nos grupos não infectados, tendo atingido valores mais elevados no grupo tratado e orquiectomizado no dia do pico parasitêmico. Este efeito ficou mais evidente nos grupos estimulados com LPS, onde o grupo tratado e orquiecomizado (IORM) apresentou maior concentração de NO. Isso pode ser observado em todos os dias experimentais, nos grupos estimulados (Figura 6).

4.6.2 Grupos Infectados

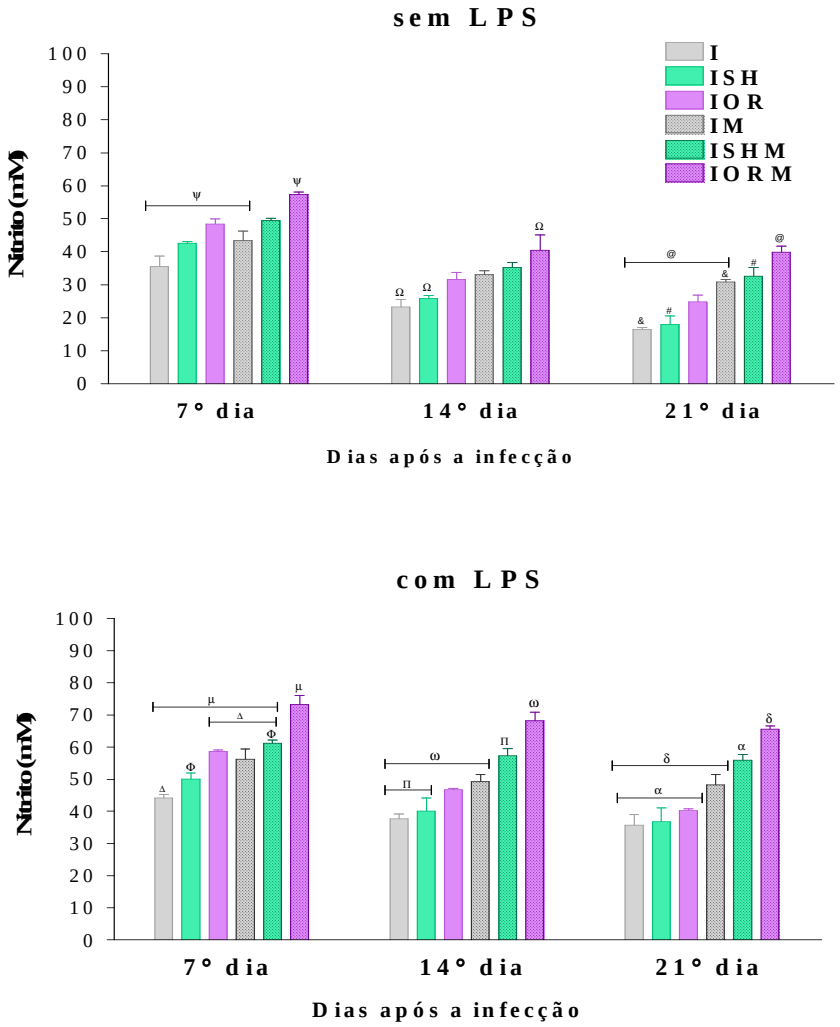


Figura 7. Concentração de NO (µM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS (10µg/mL), coletadas de ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante 7º, 14° e 21º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Sem LPS 7° $p < 0,001$ $^{\Psi}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM

Sem LPS 14° $p < 0,01$ $^{\Omega}$ IORM vs I, ISH

Sem LPS 21° $p < 0,001$ $^{\&}$ I vs IM; $^{@}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM; $^{\#}$ ISHM vs ISH

Com LPS 7° $p < 0,05$ $^{\Phi}$ ISH vs ISHM; $p < 0,01$ $^{\Delta}$ I vs IOR, IM, ISHM; $p < 0,001$ $^{\mu}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM

Com LPS 14° $p < 0,001$ $^{\Pi}$ ISHM vs I e ISH; $^{\omega}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM

Com LPS 21° $p < 0,01$ $^{\delta}$ IORM vs I, ISH, IOR e IM; $p < 0,001$ $^{\alpha}$ ISHM vs I, ISH e IOR

O grupo orquiectomizado tratado com melatonina apresentou concentrações de NO estatisticamente mais elevadas do que os grupos não tratados (I, ISH, IOR) e animais tratados com melatonina (IM) em todos os dias de experimento. A administração de melatonina associada à orquiectomia provocou um aumento significante na produção de óxido nítrico durante toda a fase aguda da infecção (Figura 7).

4.7 Linfoproliferação de Timócitos

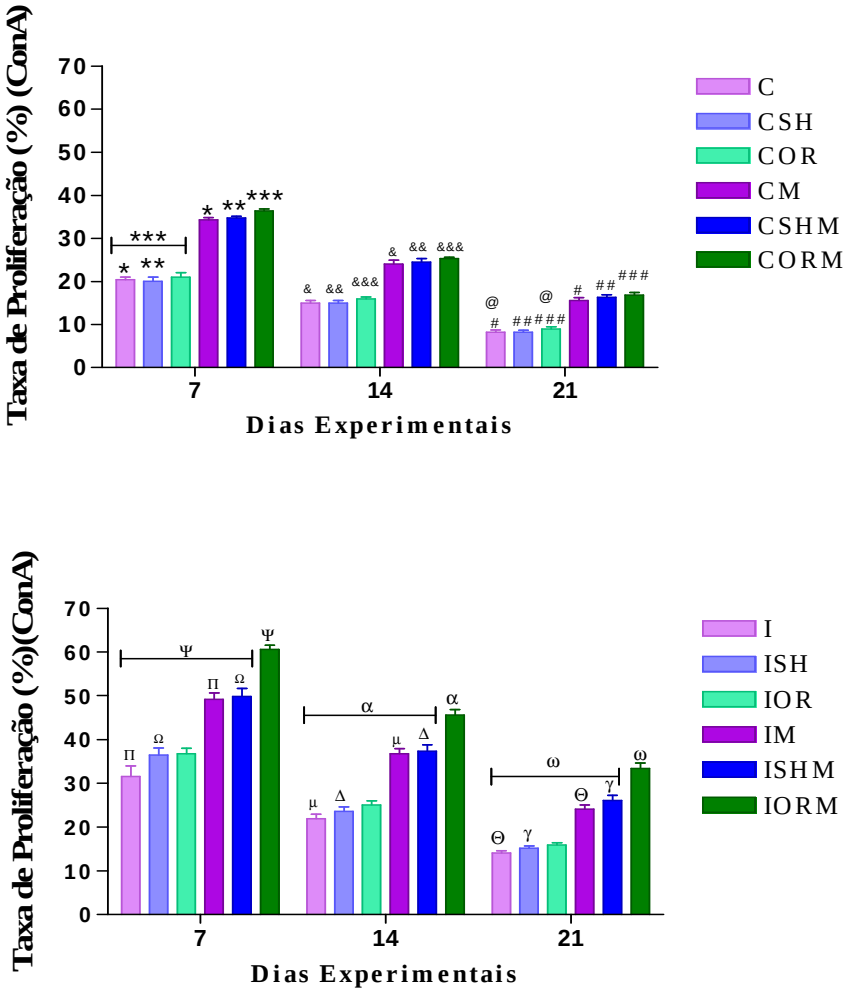


Figura 8. Proliferação de timócitos induzidos por ConA (1µg/mL) de ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda (7°, 14° e 21° dia após infecção), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5. Os dados são expressos em taxa de proliferação.

Não infectados – 7° dia $p < 0,001$ * CM vs C; ** CSHM vs CSH; *** CORM vs C, CSH, COR

Não infectados – 14° dia $p < 0,001$ $^{\&}$CM vs C; $^{\&\&}$CSHM vs CSH; $^{\&\&\&}$CORM vs COR

Não infectados – 21° dia $p < 0,001$ $^{\#}$ CM vs C; $^{\#\#}$ CSHM vs CSH; $^{\#\#\#}$ CORM vs COR; $^{@}$ COR vs CM

Infectados 7° $p < 0,001$ $^{\Pi}$ I vs IM; $^{\Omega}$ ISH vs ISHM; $^{\Psi}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM e ISHM

Infectados 14° $p < 0,001$ $^{\mu}$ I vs IM; $^{\Delta}$ ISH vs ISHM; $^{\alpha}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM,ISHM

Infectados 21° $p < 0,001$ $^{\Theta}$ I vs IM; $^{\gamma}$ ISH vs ISHM; $^{\omega}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM e ISHM

Os animais tratados com melatonina apresentam maiores taxas de proliferação de timócitos em relação aos não tratados, tanto em animais não infectados, como em animais infectados. Entre os grupos infectados, o grupo orquiectomizado tratado com melatonina apresentou as maiores taxas, mostrando diferenças significativas em relação a todos os outros grupos em todos os dias experimentais (Figura 8).

4.8 Linfoproliferação de Esplenócitos

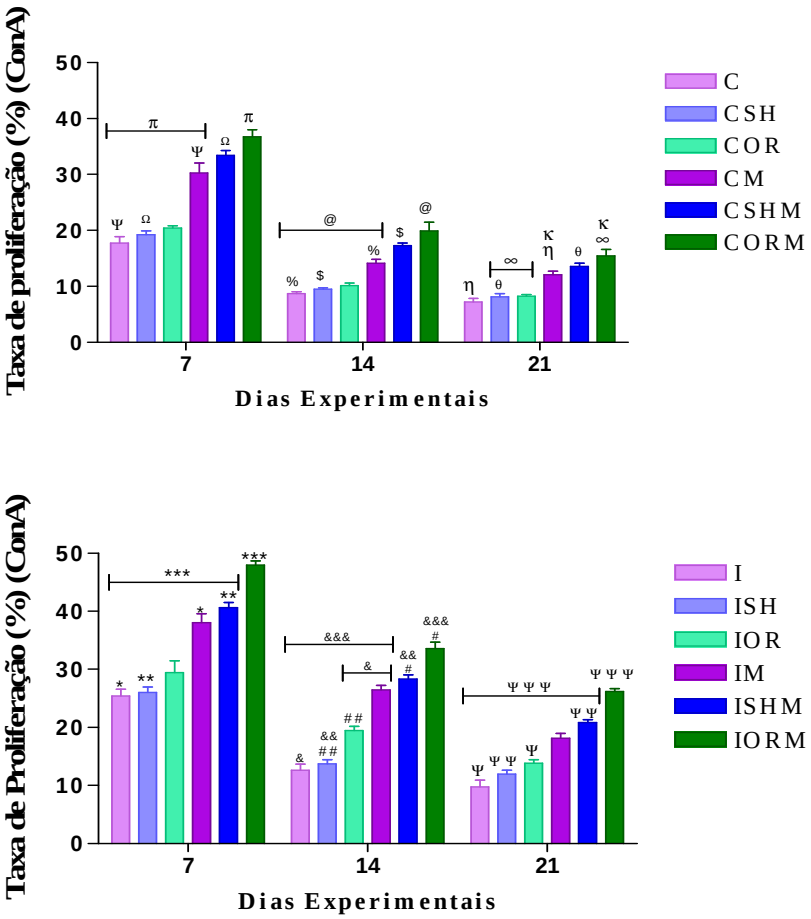


Figura 9. Proliferação de esplenócitos induzidos por ConA(1µg/mL) de ratos *Wistar* machos infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda (7°, 14° e 21° dia após infecção), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5. Os dados são expressos em taxa de proliferação.

Não Infectados 7° $p < 0,001$ $^{\Psi}$ C vs CM; $^{\Omega}$ CSH vs CSHM; $^{\pi}$ CORM vs C, CSH, COR, CM

Não Infectados 14° $p < 0,001$ $^{\%}$ C vs CM; $^{\$}$ CSH vs CSHM; $^{@}$CORM vs C, CSH, COR, CM

Não Infectados 21° $p < 0,001$ $^{\eta}$ C vs CM; $^{\theta}$ CSH vs CSHM; $^{\infty}$ CORM vs CSH, COR; $p< 0,05$ $^{\kappa}$ CORM vs CM

Infectados 7° $p < 0,001$ * IM vs I; ** ISHM vs ISH; *** IORM vs I, IOR, ISH, IM e ISHM

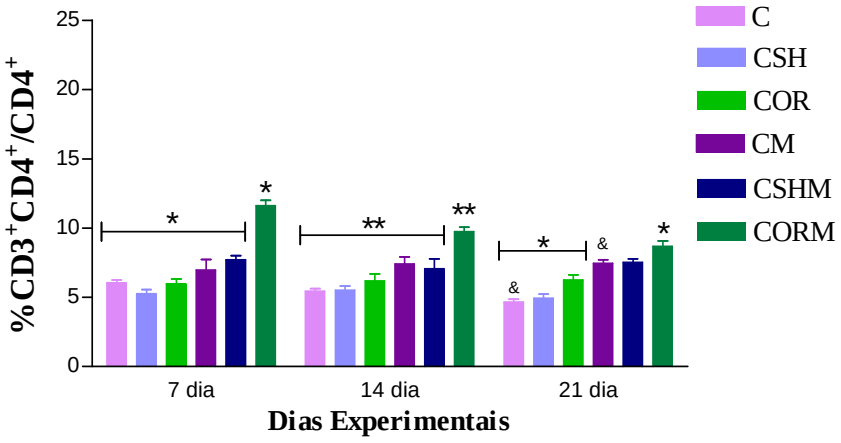
Infectados 14° $p < 0,01$ $^{\#}$ IORM vs ISHM; $^{\#\#}$ IOR vs ISH; $p < 0,001$ $^{\&}$ I vs IOR e IM; $^{\&\&}$ ISH vs ISHM; $^{\&\&\&}$ IORM vs I, ISH, IOR e IM

Infectados 21° $p < 0,01$ $^{\Psi}$ I vs IOR; $^{\Psi\Psi}$ ISH vs ISHM; $^{\Psi\Psi\Psi}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM e ISHM

A taxa de proliferação de esplenócitos seguiu o mesmo padrão da taxa de proliferação de timócitos. Os animais tratados com melatonina apresentam maiores taxas de proliferação de esplenócitos em relação aos não tratados, tanto em animais não infectados, como em animais infectados. Entre os grupos infectados, o grupo orquiectomizado tratado com melatonina apresentou as maiores taxas, mostrando diferenças significativas em relação a todos os outros grupos em todos os dias experimentais (Figura 9).

4.9 Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de fluxo

4.9.1 População celular T $CD3^+CD4^+$



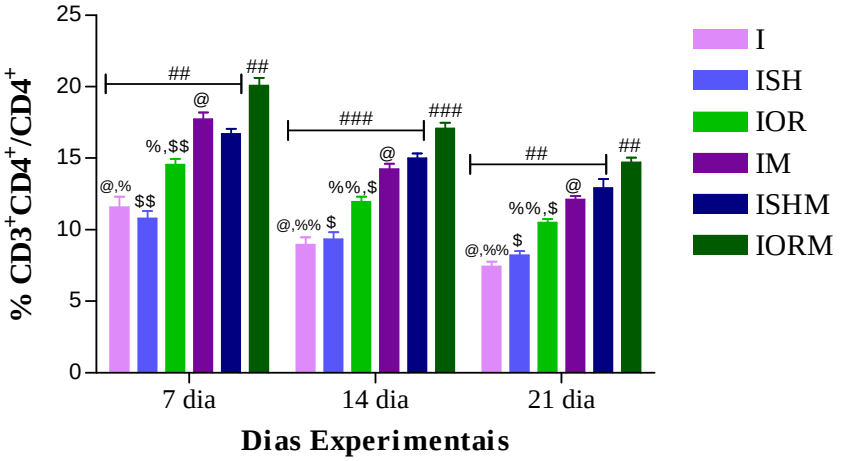


Figura 10. Análise da população de linfócitos T $CD3^+$ $CD4^+$ do baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não infectados

$p < 0,01$ $^{\&}$CM vs C (21º dia); **CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (14º dia);

$p < 0,001$ *CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (7º dia); *CORM vs C, CSH, COR (21º dia);

Infectados

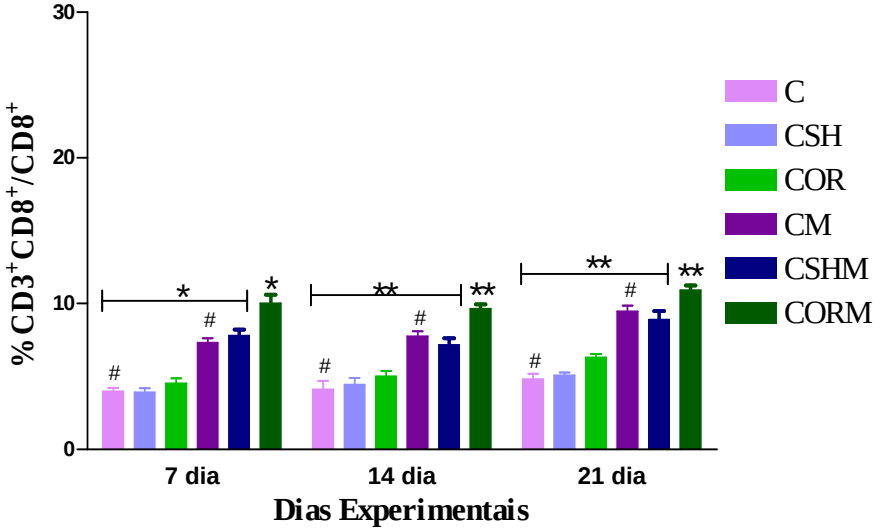
$p < 0,05$ $^{\#\#\#}$IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (14º dia);

$p < 0,01$ $^{\%}$I vs IOR (7ºdia); $^{\$}$ISH vs IOR (14º e 21ºdias);

$p < 0,001$ $^{\%\%}$I vs IOR (14º e 21ºdias); $^{\$\$}$ISH vs IOR (7ºdia); $^{@}$I vs IM (7º, 14º e 21ºdias); $^{\#\#}$IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º e 21ºdias).

Os grupos tratados com melatonina apresentaram maiores populações de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ em relação aos grupos não tratados. Este perfil é observado tanto nos animais infectados, como nos animais não infectados. Os grupos com maior porcentagem de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ são os grupos tratados e orquiectomizados, tanto infectados, como não infectados, sendo seus valores estatisticamente maiores em relação a todos os outros grupos no 7º, 14º e 21º dias de experimento (Figura 10).

4.9.2 População celular T $CD3^+CD8^+$



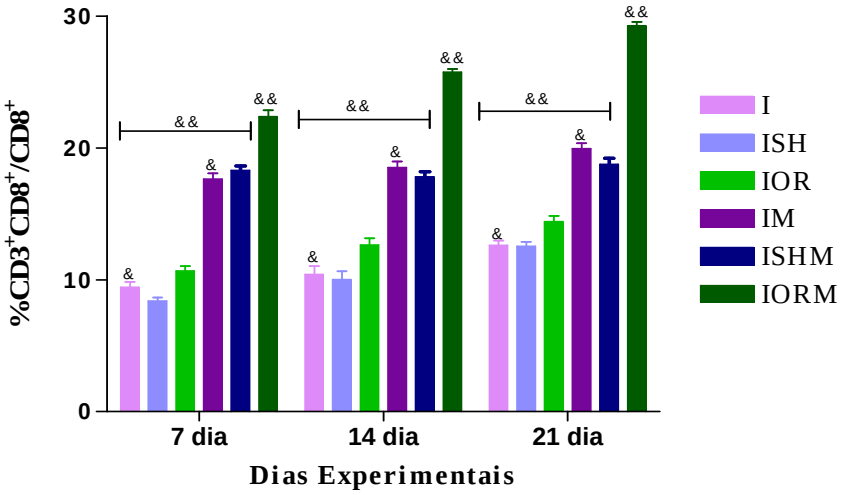


Figura 11. Análise da população de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ do baço de ratos Wistar machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não infectados

$p < 0,01$ **CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (14º e 21º dias);

$p < 0,001$ $^{\#}$C vs CM (7º, 14º e 21º dias); *CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (7º dia);

Infectados

$p < 0,001$ $^{\&}$I vs IM (7º, 14º e 21º dias); $^{\&\&}$IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º, 14º e 21º dias).

As populações de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ demonstraram o mesmo perfil observado nas populações linfócitos T $CD4^+CD3^+$, onde os grupos tratados com melatonina apresentaram maiores populações de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ em relação aos grupos não tratados, tanto nos animais infectados, como nos animais não infectados. Também se observa que os maiores valores de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ são encontrados nos grupos tratados e orquiectomizados, tanto infectados, como não infectados, sendo seus valores estatisticamente maiores em relação a todos os outros grupos nos três dias experimentais propostos (Figura 11).

4.10 Histologia Cardíaca

4.10.1 Animais não infectados não tratados (C) e tratados com melatonina (CM)

Aspecto histológico normal de fibras cardíacas dos animais não infectados tratados e não tratados.

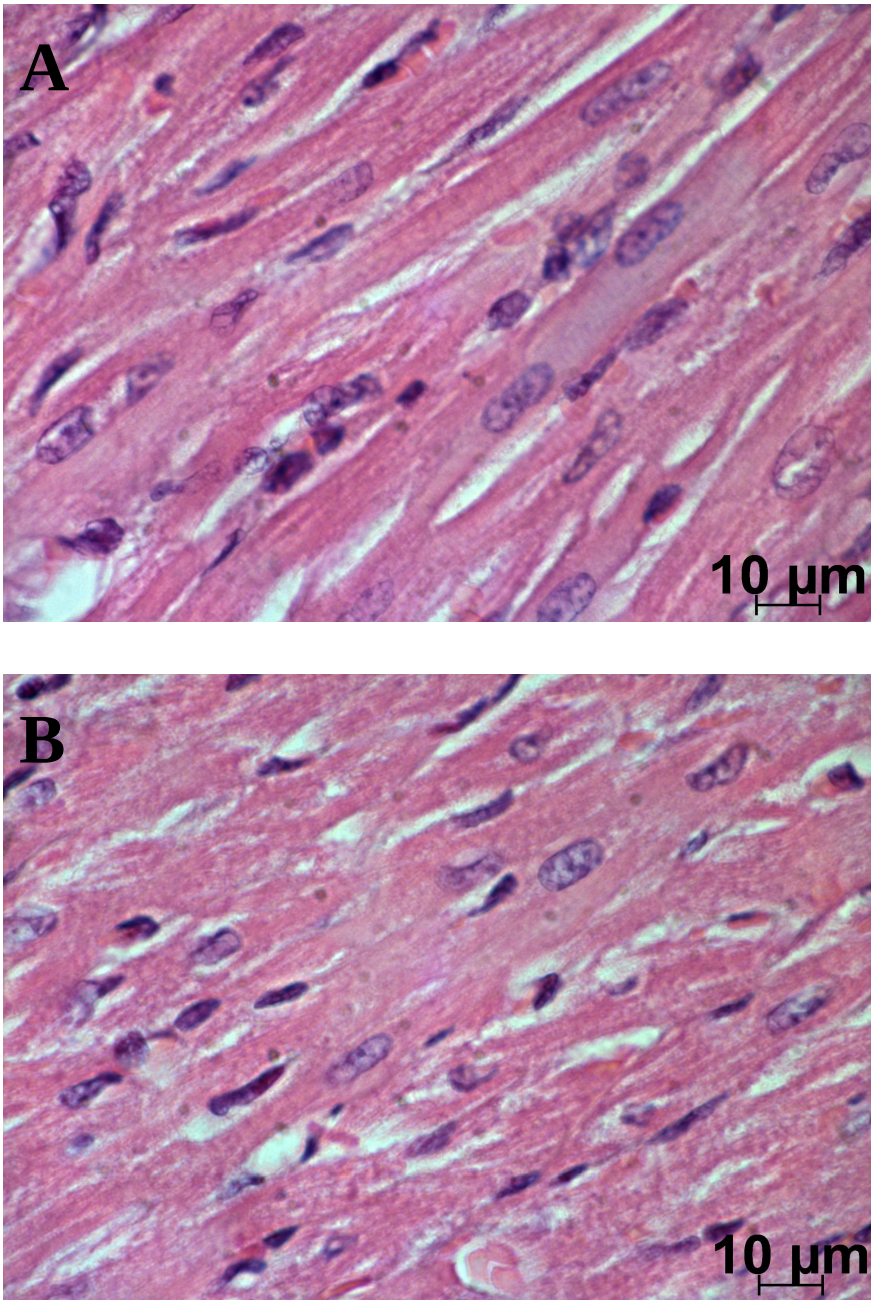


Figura 12. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos não infectados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X).

4.10.2 Animais sham não tratados (CSH) e sham tratados com melatonina (CSHM)

Aspecto histológico normal de fibras cardíacas dos animais não infectados sham tratados e não tratados.

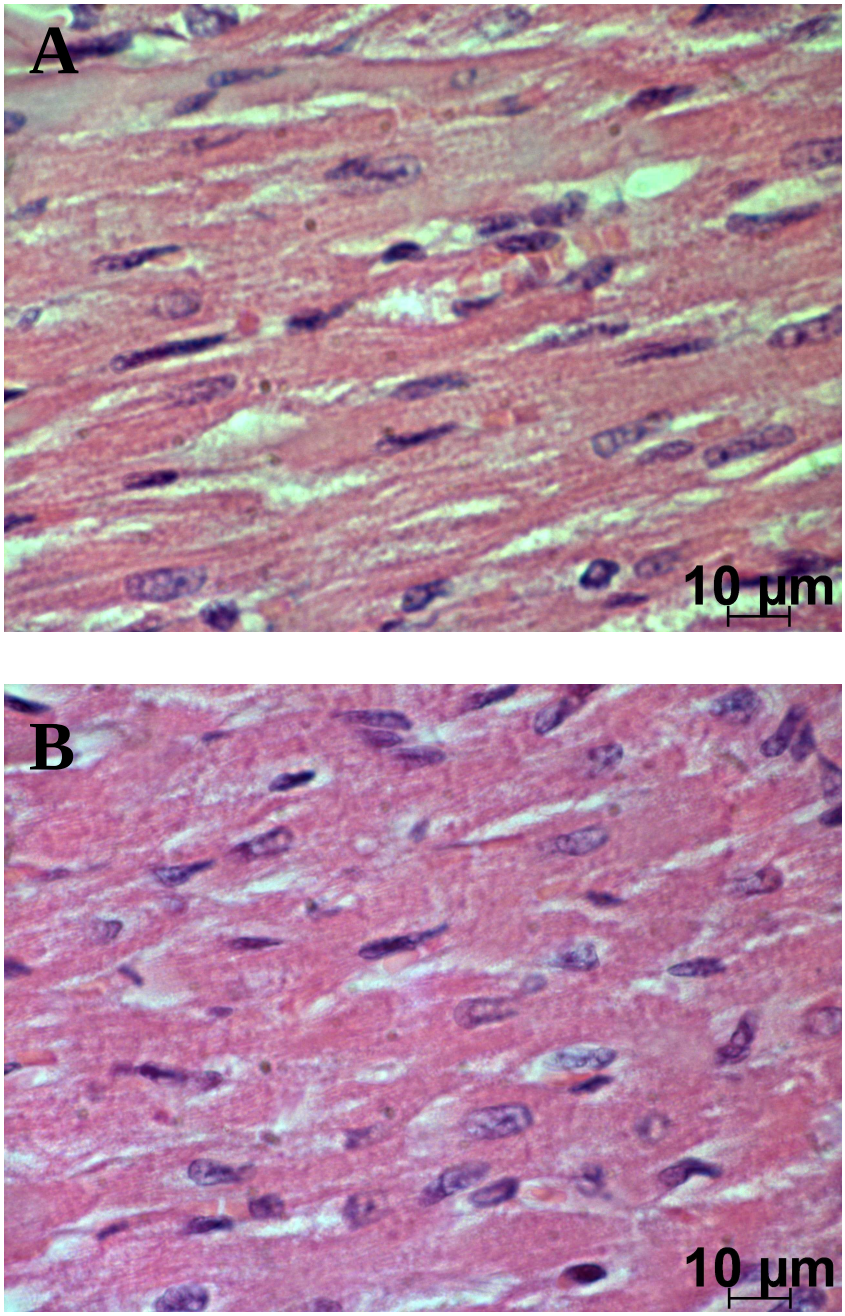


Figura 13. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos não infectados Sham, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X).

4.10.3 Animais orquiectomizados não tratados (COR) e orquiectomizados tratados com melatonina (CORM)

Aspecto histológico normal de fibras cardíacas dos animais não infectados orquiectomizados tratados e não tratados.

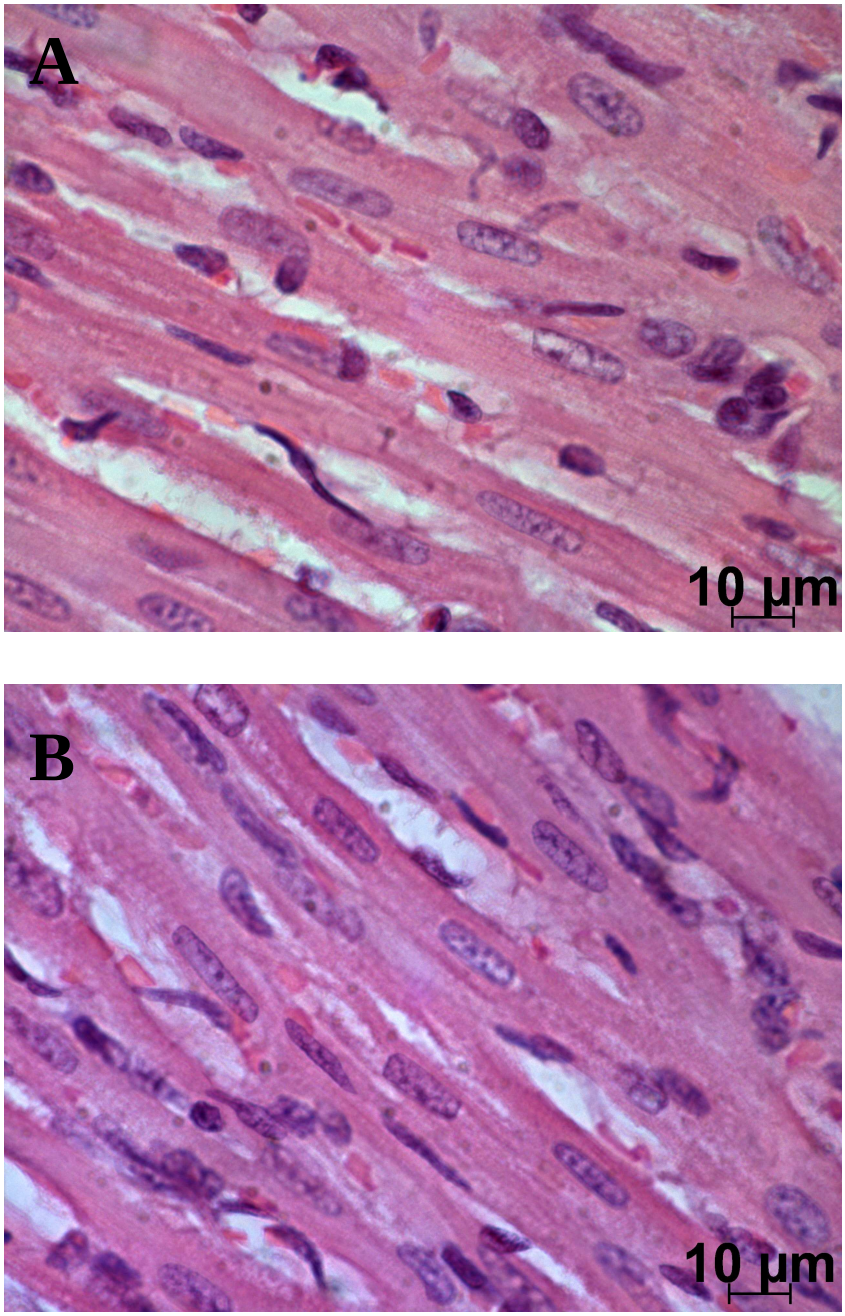


Figura 14. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos não infectados orquiectomizados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X).

4.10.4 Animais infectados não tratados (I) e tratados com melatonina (IM)

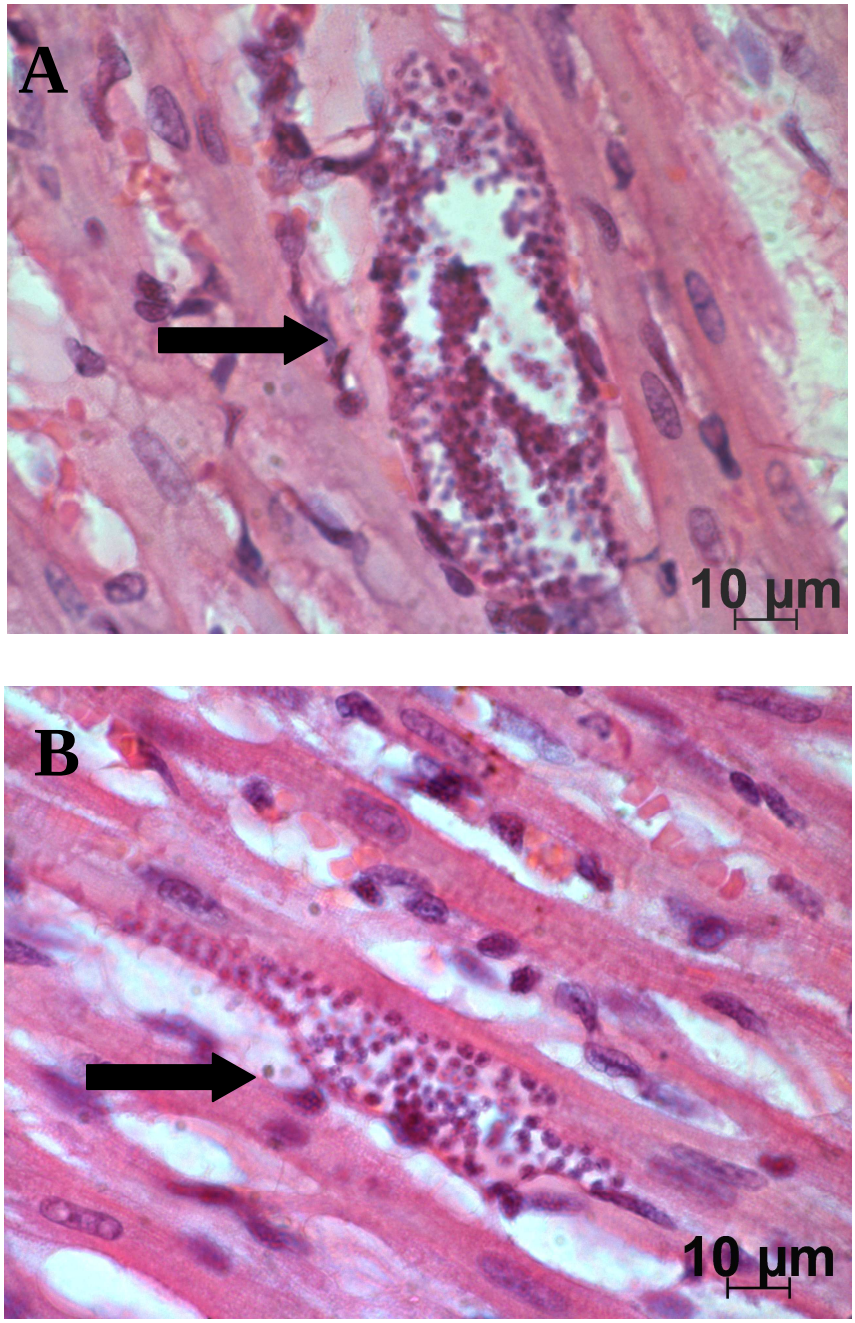


Figura 15. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X).

Durante a leitura das lâminas, observou-se nos cortes de animais não tratados (Figura 15A) a presença de grandes e numerosos ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas, enquanto os animais tratados (Figura 15B) com o hormônio melatonina, apresentaram pequenos e poucos ninhos de amastigota nas fibras cardíacas. Quanto ao processo inflamatório, observou-se uma melhora no aspecto histológico, com a redução dos infiltrados celulares nos grupos tratados com melatonina.

4.10.5 Animais infectados Sham não tratados (ISH) e tratados com melatonina (ISHM)

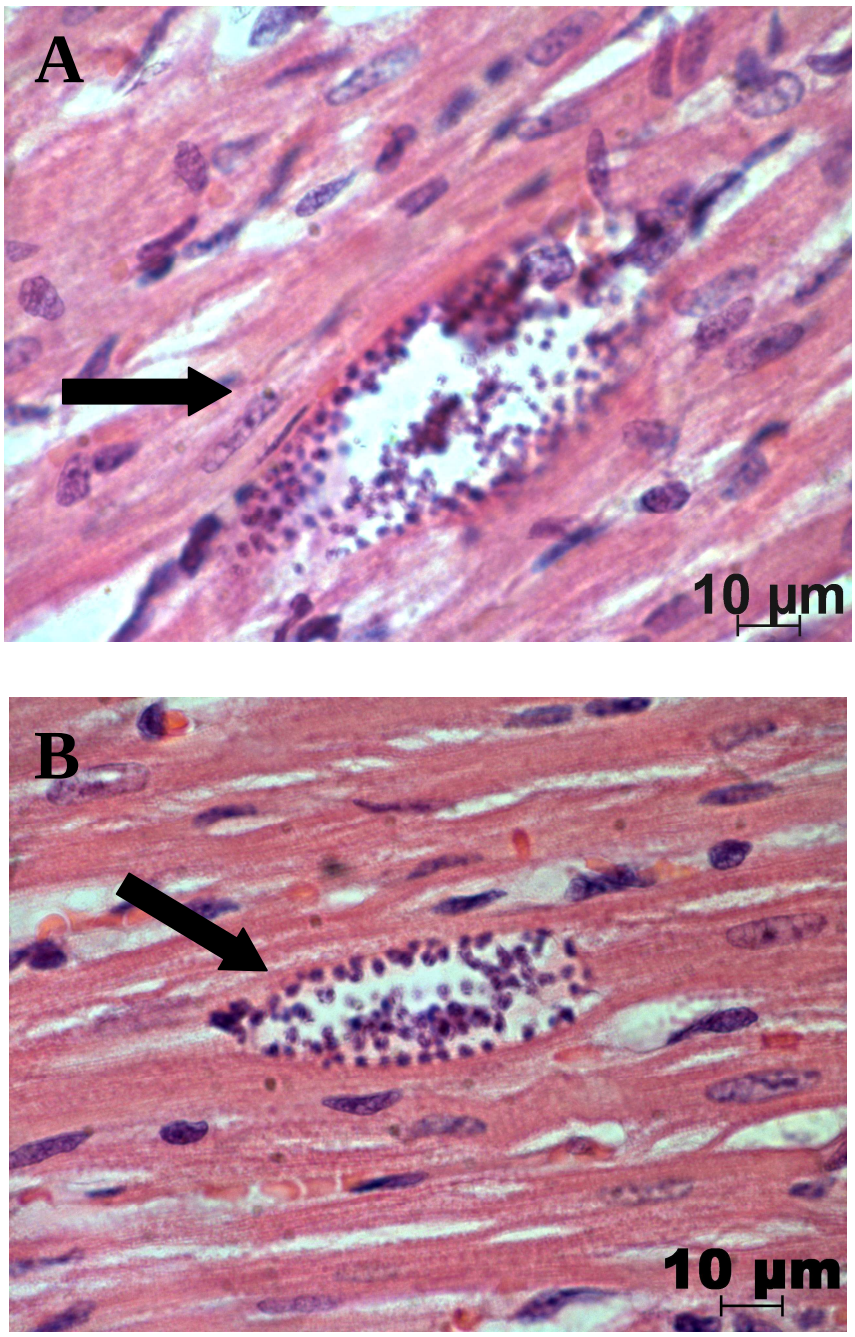
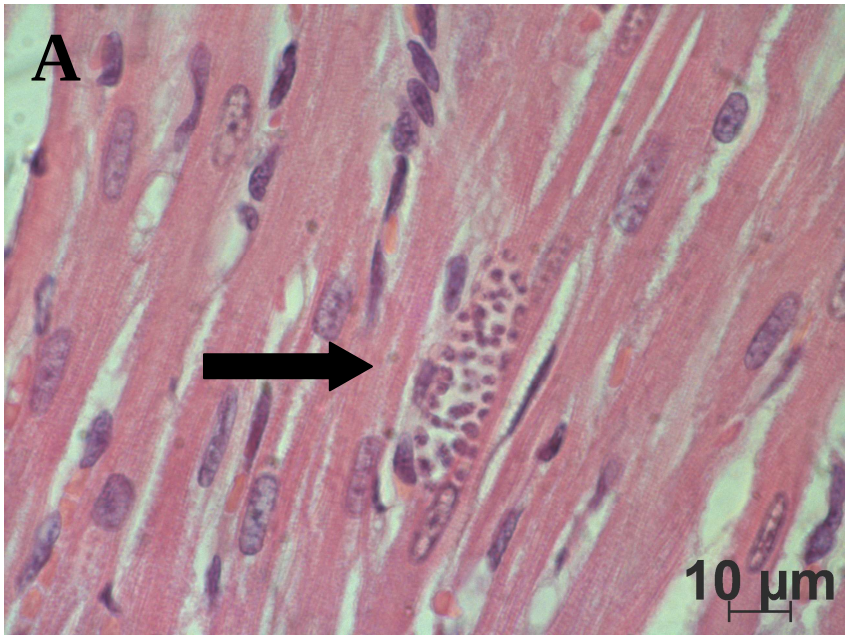


Figura 16. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados Sham, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X).

A observação dos cortes enfatizou o que já havia sido descrito para os grupos infectados (I) e infectado tratado (IM): presença de grandes e numerosos ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas nos animais não tratados (Figura 16A), enquanto os animais tratados com o hormônio melatonina (Figura 16B), apresentaram pequenos e poucos ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas.

4.10.6 Animais infectados orquiectomizados não tratados (IOR) e tratados com melatonina (IORM)



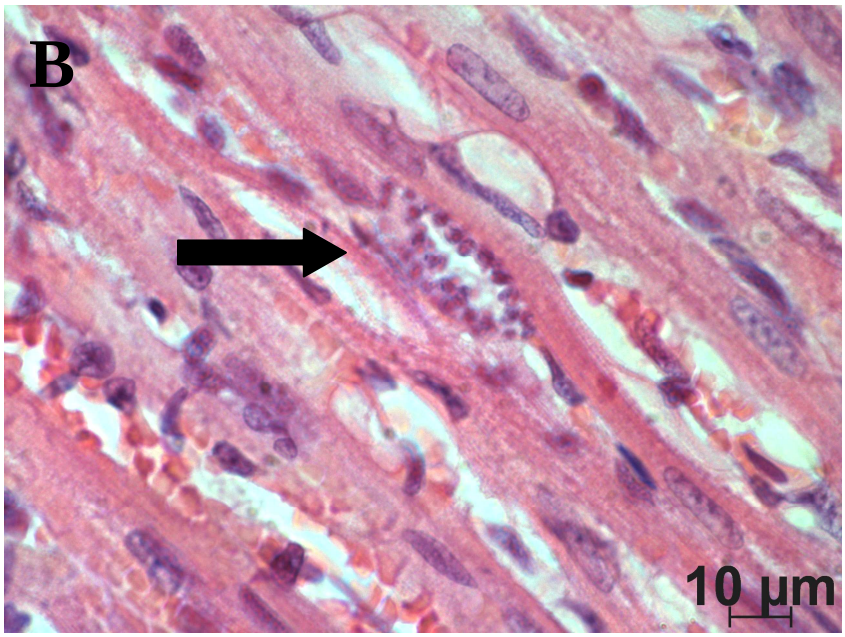


Figura 17. Aspectos histológicos (6µm) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados orquiectomizados, não tratados (A) e tratados com melatonina (B), colhidos no 7º dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (1000X).

Os animais do grupo orquiectomizado e tratados com melatonina (IORM) (Figura 17B) apresentaram um número muito reduzido de ninhos, bem como de tamanho reduzido. O grupo orquiectomizado sem tratamento (IOR) (Figura 17A) apresentou também menor número de ninhos e de menor tamanho, em relação aos outros grupos infectados (I,ISH), mas a diferença realmente notável foi a redução ocorrida no primeiro grupo citado (IORM). Observa-se aqui um efeito sinérgico da orquiectomia e do tratamento com melatonina, na luta contra a invasão parasitária. Quanto ao processo inflamatório, os grupos tratados com melatonina e orquiectomizados, apresentaram a maior redução dos infiltrados celulares, em relação a todos os outros grupos.

4.11 Intensidade parasitária cardíaca

Tabela 4. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos *Wistar* machos infectados com 1x 10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º e 14º dia após a infecção.

Grupos Experimentais	***Número de ninhos amastigotas (Média ± DP[1])***	
(n=5)	**7º dia após a infecção**	**14º dia após a infecção**
I	45±7,2	35,0 ±8,4
ISH	39±4,6	34,00 ± 6,1
IOR	30±7,1	22,00 ± 6,2
IM	22±6,3**	15,0 ± 7,2**
ISHM	20±4,9	14,00 ± 4,9
IORM	13±5,8*	5,00 ± 3,7*

[1]*DP: Desvio Padrão*

Infectado (I), Infectado Tratado com Melatonina (IM), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado Orquiectomizado Tratado com Melatonina (IORM), Infectado Sham (ISH), Infectados Sham Tratado com Melatonina (ISHM). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção n = 5. Foram contados os ninhos de amastigotas em toda a extensão dos cortes e feita uma médica dos 6 cortes examinados.

*$p<0,05$ IORM vs I, ISH e IOR (7º e 14º dias após infecção)

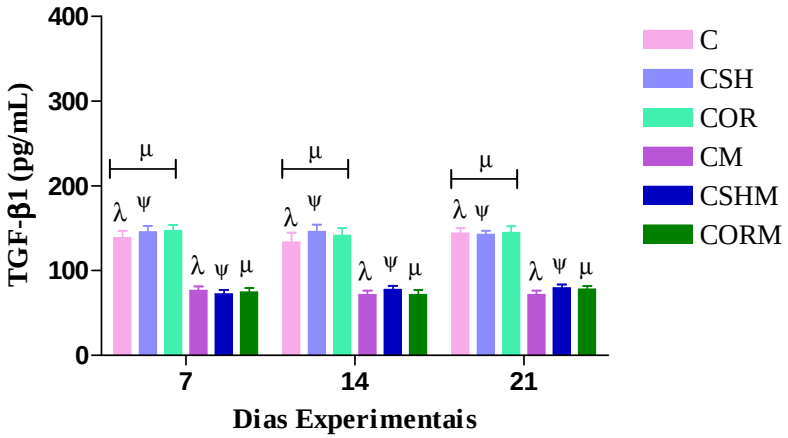
**$p<0,001$ IM vs I e IOR (7º e 14º dias após infecção)

Os grupos tratados com melatonina apresentaram parasitismo tecidual menor em relação aos não tratados, como já havia sido ilustrado em trabalho anterior (SANTELLO et al., 2007). Os grupos orquiectomizados apresentaram menor número de ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas, porém os animais orquiectomizados e tratados apresentaram menor parasitismo tecidual em relação a todos os outros grupos, evidenciando a ação concomitante

da melatonina e a influência dos hormônios sexuais na resposta ao parasita (Tabela 4). Isso mostra a ação sinérgica da orquiectomia e do tratamento com melatonina diminuindo, drasticamente, o parasitismo tecidual no grupo tratado e também submetido à cirurgia.

4.12 Dosagem de citocinas

4.12.1 TGF-β1



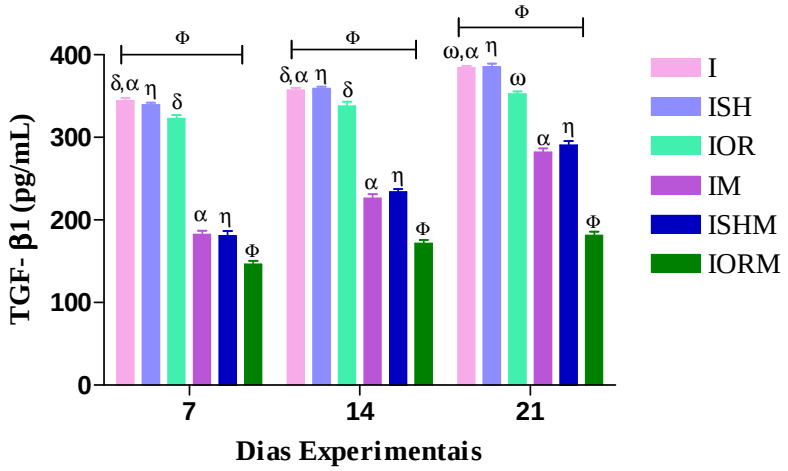


Figura 18. Concentração de TGF-β1 determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não Infectados

$p < 0,001$ $^{\lambda}$C vs CM (7º, 14ºe 21º dias);; $^{\psi}$CSH vs CSHM (7º, 14º e 21º dias); $^{\mu}$CORM vs C, CSH, COR (7º, 14ºe 21º dias);

Infectados

$p<0,05$ $^{\delta}$I vs IOR (7º e 14º dias); $p < 0,001$ $^{\omega}$I vs IOR (21º dia)**;** $^{\Phi}$IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º, 14º e 21º dias); $^{\alpha}$IM vs I(7º, 14º e 21º dias); $^{\eta}$ISHM vs ISH (7º, 14º e 21º dias).

As concentrações de TGF-β1 nos grupos não infectados apresentaram valores mais baixos em relação aos grupos infectados. Todos os grupos tratados com melatonina apresentaram valores estatisticamente mais baixos em relação aos grupos que não receberam tal hormônio. Os níveis de TGF-β1, nos grupos infectados, foram aumentando com a evolução para a fase crônica da doença, porém, os grupos tratados com melatonina (IM, ISHM, IORM), apresentaram concentrações estatisticamente mais baixas desta citocina, em relação aos grupos não tratados (I, ISH, IOR). O grupo orquiectomizado e tratado com melatonina (IORM) foi o que apresentou os menores níveis de TGF-β1 (Figura 18). Este resultado confirma outros estudos que afirmam ser o TGF-β1 uma citocina pró-inflamatória em baixas concentrações e antiinflamatória em altas concentrações (OMER et al., 2000).

4.12.2 TNF-α

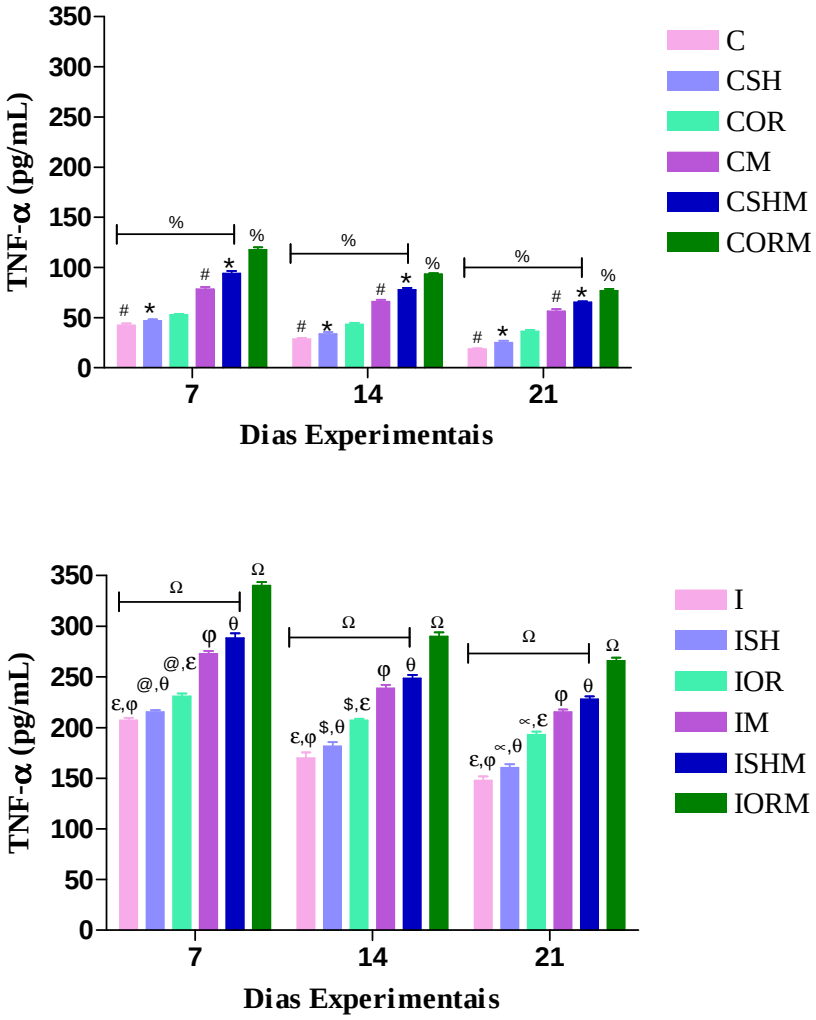


Figura 19. Concentração de TNF-α determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não Infectados

p < 0,001$^{\#}$C vs CM (7º, 14ºe 21º dias); *CSH vs CSHM (7º, 14ºe 21º dias); $^{\%}$CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (7º, 14ºe 21º dias);

Infectados

p<0,05 $^{@}$ISH vs IOR (7º dia); p<0,01 $^{\$}$ISH vs IOR (14º dia); p < 0,001 $^{\varepsilon\propto}$ISH vs IOR (21º dia)**;** I vs IOR(7º, 14ºe 21º dias); $^{\Omega}$IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º, 14ºe 21º dias); $^{\varphi}$IM vs I (7º, 14ºe 21º dias); $^{\theta}$ISHM vs ISH (7º, 14ºe 21º dias).

Os grupos tratados com melatonina apresentaram concentrações de TNF-α maiores em relação aos grupos não tratados, tanto nos grupos infectados, como nos grupos não infectados. Não houve diferenças significativas entre os grupos não infectados e não tratados (C, CSH, COR) nos dias experimentais; já entre os grupos infectados não tratados (I, ISH, IOR), o grupo orquiectomizado (IOR) apresentou concentrações de TNF-α maiores em relação aos outros dois grupos (I, ISH) durante toda a evolução da doença experimental. Os grupos orquiectomizados e tratados com melatonina (CORM, IORM) apresentaram os níveis mais elevados de TNF-α em relação a todos os outros grupos, com valores estatisticamente significativos (Figura 19). Os valores apresentaram-se maiores no 7º dia após a infecção, correspondente ao pico parasitêmico, observado anteriormente na Figura 4. Esta ação positiva da melatonina sobre o sistema imune já havia sido observada em trabalhos anteriores com *T. cruzi* (SANTELLO et al., 2008a), porém a orquiectomia potencializou este efeito.

4.12.3 IFN-γ

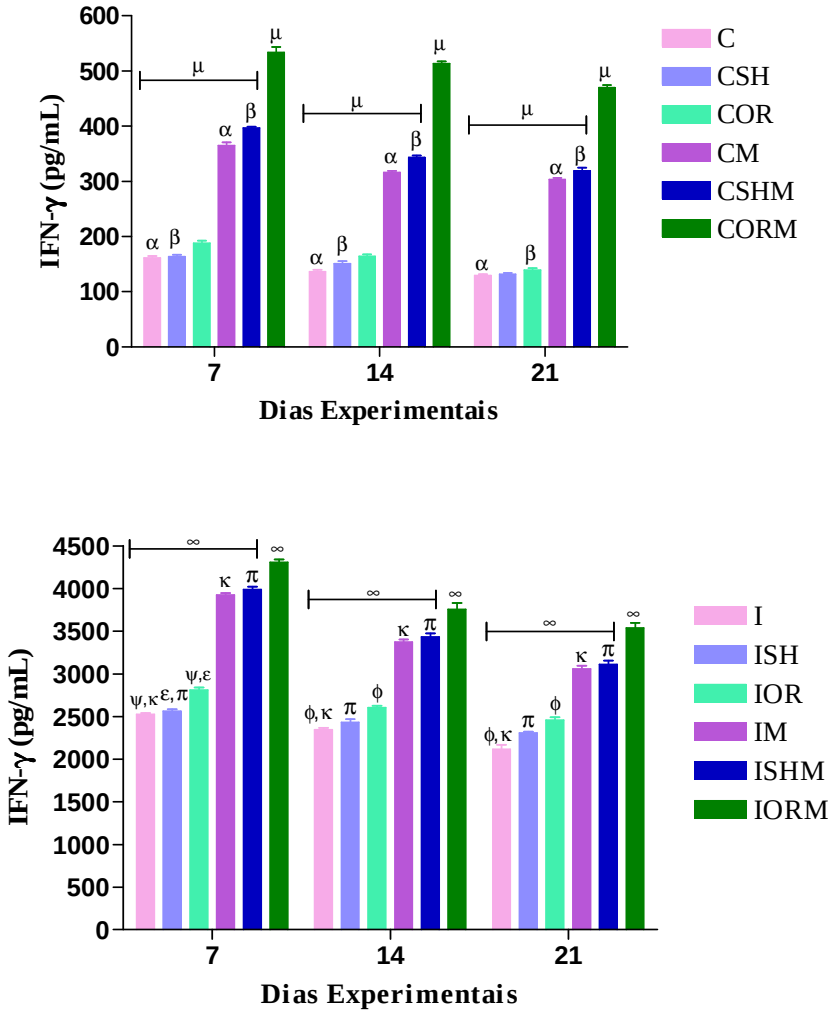


Figura 20. Concentração de IFN-γ determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não Infectados

p<0,001 $^{\alpha}$C vs CM (7º, 14º e 21º dias); $^{\beta}$CSH vs CSHM(7º, 14º e 21º dias); $^{\mu}$CORM vs C, CM, CSH, , COR, CSHM (7º, 14º e 21º dias);

Infectados

p< 0,05 $^{\psi}$I vs IOR (7º dia); p< 0,01 $^{\phi}$I vs IOR (14º e 21º dias); $^{\kappa}$I vs IM (7º, 14º e 21º dias); $^{\varepsilon}$ISH vs IOR (7º dia); p < 0.001 $^{\pi}$ISH vs ISHM (7º, 14º e 21º dias); $^{\infty}$IORM vs I, IM, ISH, IOR, ISHM (7º, 14º e 21º dias).

Não houve diferenças significativas entre os grupos não infectados e não tratados nos dias experimentais; já entre os grupos infectados não tratados, o grupo orquiectomizado (IOR) apresentou concentrações de IFN-γ maiores em relação ao grupo infectado (I) durante toda a evolução da doença experimental. Em todos os grupos tratados com melatonina, as concentrações de IFN-γ apresentaram-se estatisticamente maiores em relação aos grupos não tratados, tanto nos grupos infectados, como nos grupos não infectados. As concentrações de IFN-γ elevadas durante a evolução da doença, principalmente no 7º dia de experimento (pico parasitêmico), apontam para uma resposta imune efetiva diante da presença parasitária, já que esta citocina é muito importante na montagem dos mecanismos de defesa para o controle da invasão parasitária. Os grupos orquiectomizados e tratados com melatonina (CORM, IORM) apresentaram os níveis mais elevados de IFN-γ, mostrando uma somação de efeitos a favor do hospedeiro (Figura 20).

4.12.4 IL-2

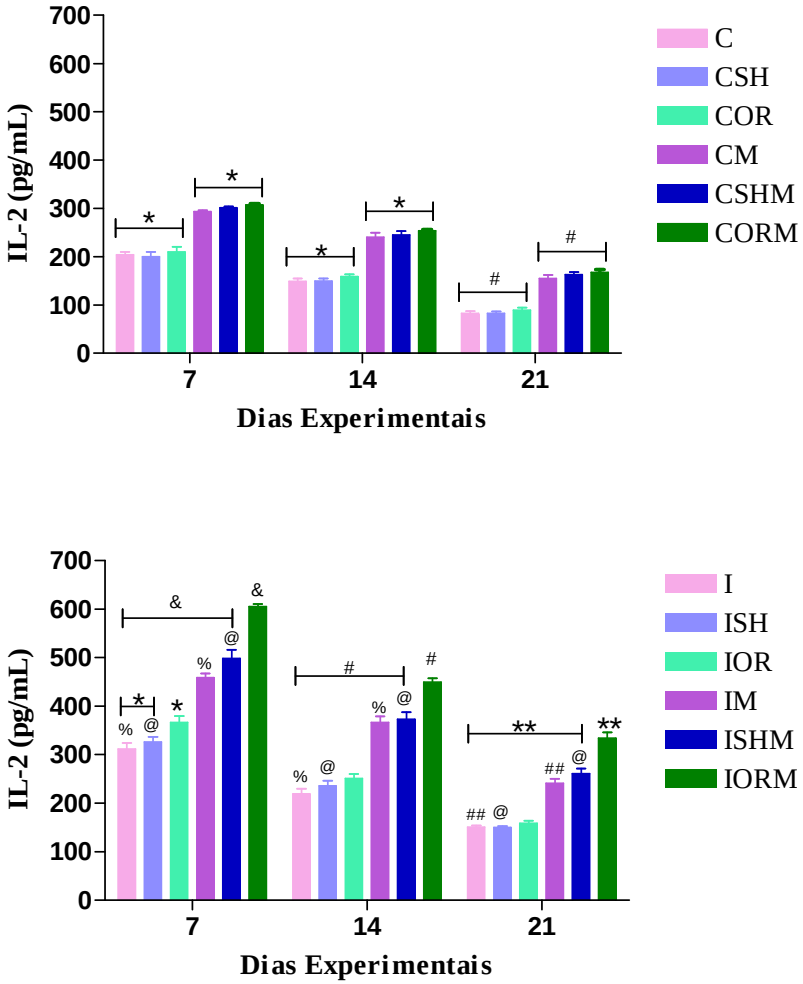


Figura 21. Concentração de IL-2 determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não infectados

$p < 0,001$ # CM, CSH, CORM vs C, SH e COR (21º dia); $p < 0,01$ *CM, CSH, CORM vs C, SH e COR (7º e 14º dias);

Infectados

$p < 0,001$ **IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (21º dia); @ISHM vs ISH (7º, 14ºe 21º dias); ## IM vs I (21º dia); $p < 0,01$ & IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º dia); % IM vs I (7º e 14º dias); $p < 0,05$ * IOR vs I, ISH (7º dia); #IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (14º dia).

A orquiectomia levou ao aumento das concentrações de IL-2 no 7º dia após a infecção. O tratamento com melatonina também resultou em um aumento nos níveis de IL-2 em todos os grupos (CM, CSHM, CORM, IM, ISHM, IORM), quando comparados aos grupos correspondentes não tratados (C, SH, OR, I, ISH, IOR). Quando a orquiectomia se somou ao tratamento com melatonina (IORM), obtiveram-se níveis significativamente mais elevados de IL-2 em relação a todos os outros grupos (Figura 14). Os níveis de IL-2 apresentaram-se mais elevados no início da infecção, chegando a um valor máximo no pico parasitêmico (7º dia) e diminuindo durante a evolução para fase crônica da doença (Figura 21).

4.12.5 IL-4

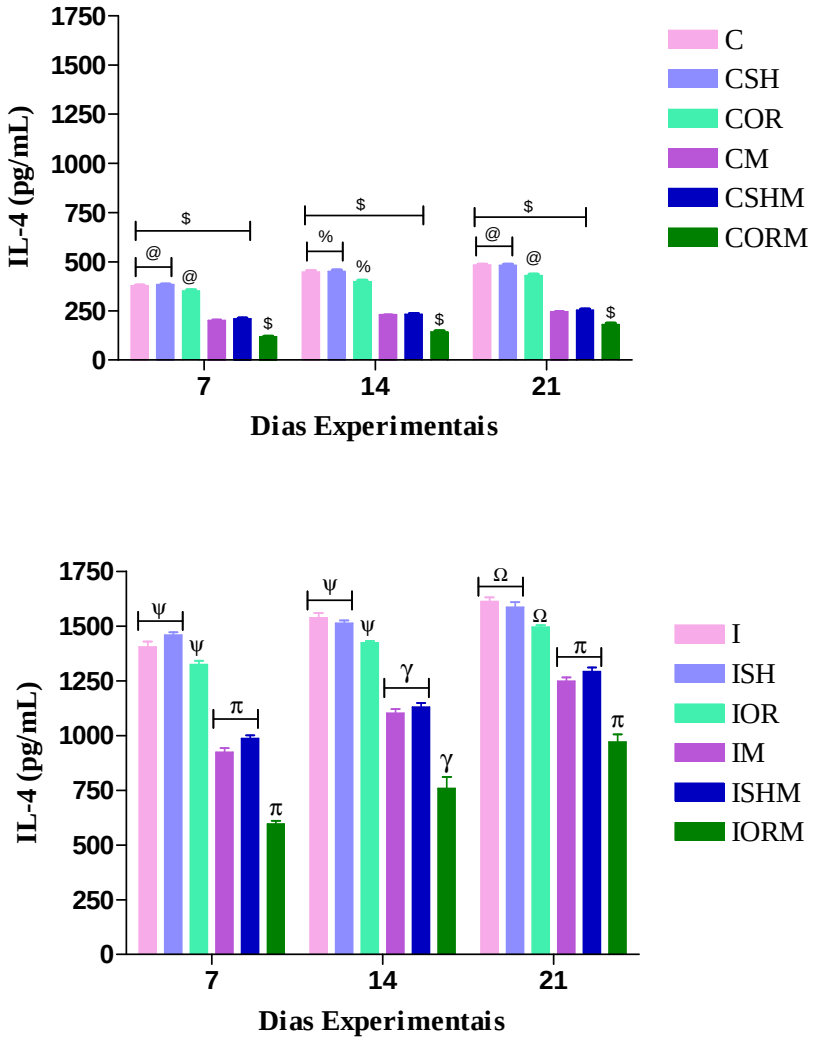


Figura 22. Concentração de IL-4 determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n=5.

Não infectados

$p < 0,001$ $^{@}$COR vs C, CSH (7º e 21º dias); $p < 0,01$ $^{\$}$CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (7º, 14ºe 21º dias); $p < 0,05$ $^{\%}$COR vs C, SH (14º dia);

Infectados

$p < 0,001$ $^{\Psi}$IOR vs I, ISH (7º e 14º dias); $p < 0,01$ $^{\pi}$IORM vs IM, ISHM (7º e 21º dias); $p<0,05$ $^{\Omega}$IOR vs I, ISH (21º dia); $^{\gamma}$ IORM vs IM, ISHM (14º dia).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-4 entre os grupos não infectados (C) e não infectado Sham (CSH) em nenhum dos dias experimentais. O grupo não infectado orquiectomizado, porém, apresentou valores menores do que os grupos citados anteriormente, durante todos os procedimentos. Os grupos tratados apresentaram níveis bem menores em relação aos grupos não tratados, com destaque para o grupo tratado orquiectomizado (CORM). O mesmo perfil foi observado nos grupos infectados, sendo que o grupo infectado orquiectomizado tratado (IORM), foi aquele que apresentou os menores níveis de IL-4 em relação a todos os outros grupos experimentais. Os níveis de IL-4 foram menores no início da infecção (7º dia), aumentando no decorrer dos dias experimentais (Figura 22).

4.12.6 IL-10

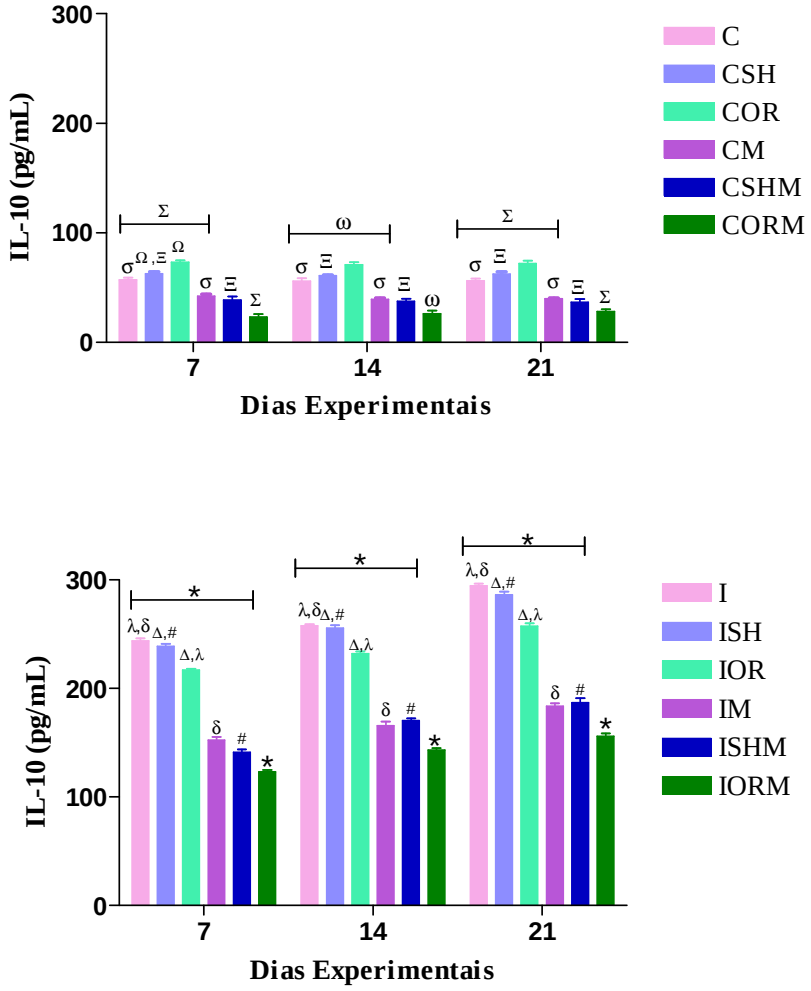


Figura 23. Concentração de IL-10 determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não infectados

$p < 0.05$ $^{\Omega}$CSH vs COR (7º dia); $p < 0,01$ $^{\Sigma}$CORM vs C, CSH, COR, CM (7º e 21º dias);

$p < 0.001$ $^{\sigma}$C vs CM (7º, 14º e 21º dias); $^{\Xi}$CSH vs CSHM(7º, 14º e 21º dias); $^{\omega}$CORM vs C, CSH, COR, CM (14º dia);

Infectados

$p < 0.05$ $^{\Delta}$ISH vs IOR (7º, 14º e 21º dias); $p < 0.01$ *IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º, 14º e 21º dias); $p < 0.001$ $^{\lambda}$I vs IOR (7º, 14º e 21º dias); $^{\delta}$I vs IM (7º, 14º e 21º dias); $^{\#}$ISH vs ISHM (7º, 14º e 21º dias).

Dentro dos grupos controles, as concentrações de IL-10 não sofreram grandes alterações durante os dias experimentais; observando os grupos infectados, tratados e não tratados, as variações foram maiores, onde os níveis desta citocina foram aumentando com a evolução para a fase crônica da doença. Este perfil ilustra o papel antiinflamatório da citocina em questão, importante na delimitação da resposta imune, prevenindo uma hiper-atividade, o que deve ocorrer após a fase aguda doença. Os níveis de IL-10 nos grupos não infectados tratados com melatonina (CM, CSHM, CORM) apresentaram-se menores em relação aos seus grupos correspondentes não tratados (C, CSH, COR). O mesmo se observou nos grupos infectados, onde os tratados (IM, ISHM, IORM), apresentaram níveis menores de IL-10. Os grupos orquiectomizados tratados com melatonina (CORM, IORM) apresentaram as menores concentrações em relação a todos os outros grupos, porém os níveis foram aumentando durante os dias experimentais, seguindo o mesmo perfil desejável já supracitado (Figura 23).

4.12.7 IL-6

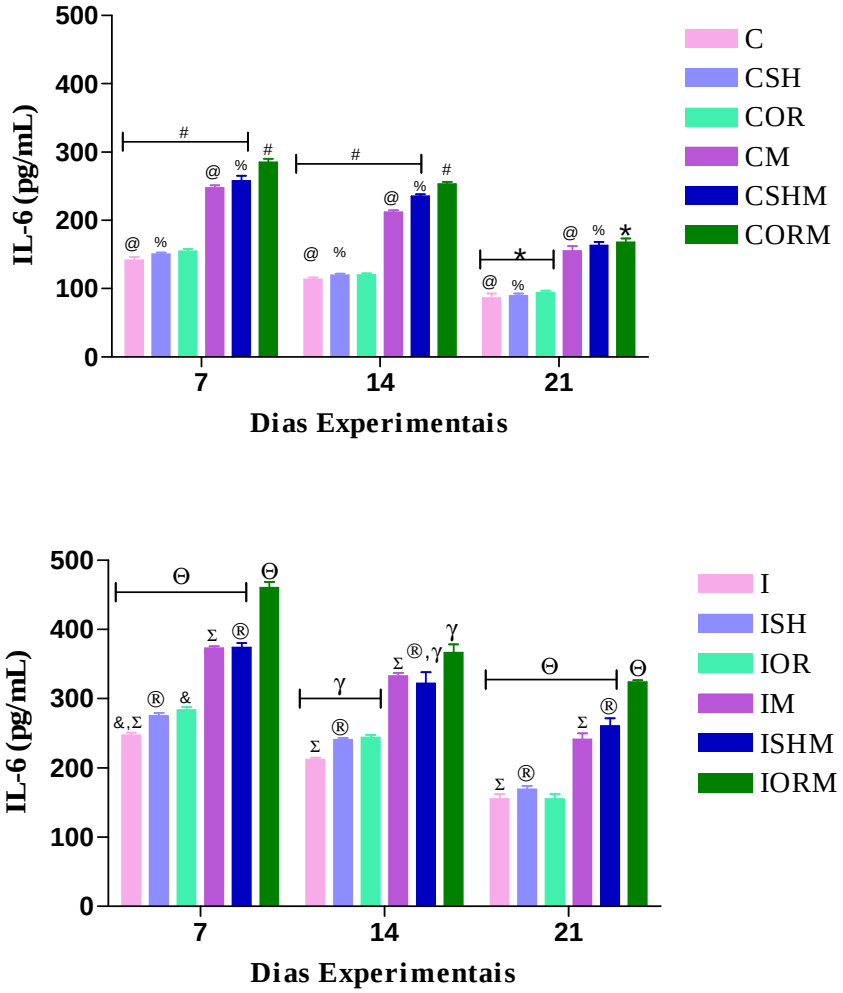


Figura 24. Concentração de IL-6 determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não infectados

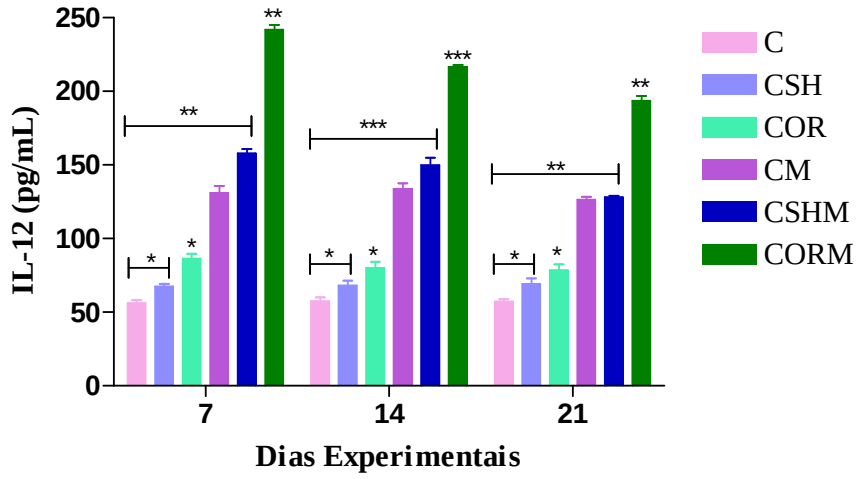
$p < 0.05$ $^{\#}$CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (7º e 14º dias); $p < 0.001$ $^{@}$C vs CM (7º, 14º e 21º dias); $^{\%}$CSH vs CSHM (7º, 14º e 21º dias); *CORM vs C, CSH, COR (21º dia);

Infectados

$p < 0.05$ $^{\&}$I vs IOR (7º dia); $^{®}$ISH vs ISHM (7º, 14º e 21º dias); $p < 0.01$ $^{\Sigma}$I vs IM (7º, 14º e 21º dias); $^{\Theta}$IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º dia e 21º dias); $p < 0.001$ $^{\gamma}$IORM vs I, ISH, IOR, ISHM (14º dia).

O tratamento com melatonina mostrou-se efetivo na elevação da concentração de todos os grupos, infectados ou não. Os níveis de IL-6 apresentaram mais elevados nos grupos infectados em relação aos grupos não infectados. O grupo infectado (I) apresentou menor concentração de IL-6 em relação ao grupo infectado orquiectomizado (IOR) no 7º dia após a infecção. Dentro dos grupos infectados tratados com melatonina (IM, ISHM, IORM), o grupo orquiectomizado (IORM) apresentou os maiores valores de IL-6 (Figura 24). A interleucina-6 é uma importante citocina pró-inflamatória para a defesa do hospedeiro contra patógenos, possuindo múltiplas atividades biológicas, entre elas, coestimulação de linfócitos T e produção de imunoglobulinas.

4.12.8 IL-12



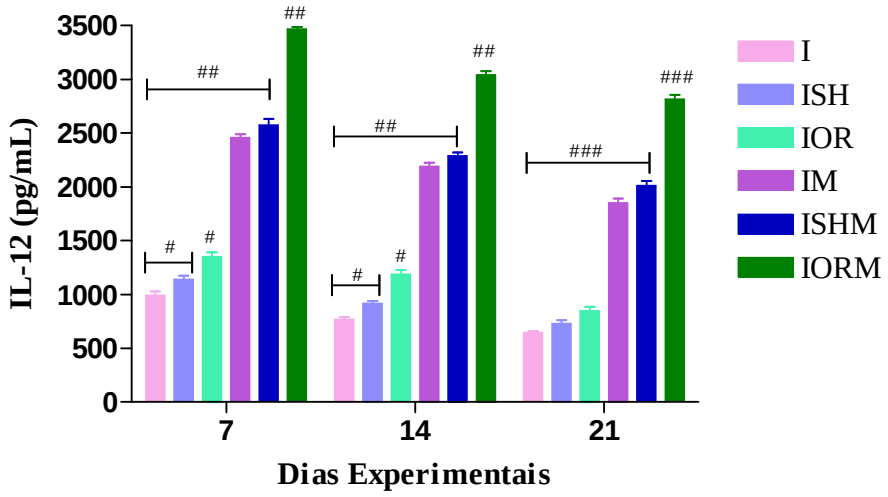


Figura 25. Concentração de IL-12 determinada no soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com $1x10^5$ formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º, 14° e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com Melatonina (CM), Controle Sham tratado com Melatonina (CSHM), Controle Orquiectomizado tratado com Melatonina (CORM), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com Melatonina (IM), Infectado Sham tratado com Melatonina (ISHM), Infectado Orquiectomizado tratado com Melatonina (IORM). Para cada grupo experimental n = 5.

Não infectados

$p < 0{,}001$ *COR vs C, SH (7º e 14º e 21º dias); ***CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (14º dia);

$p < 0{,}01$ **CORM vs C, CSH, COR, CM, CSHM (7º e 21º dias);

Infectados

$p < 0{,}001$ $^{\#\#}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (21º dia); $p < 0{,}01$ $^{\#\#}$ IORM vs I, ISH, IOR, IM, ISHM (7º e 14º dias); $p < 0{,}05$ $^{\#}$IOR vs I, ISH (7º e 14º dias).

A orquiectomia levou ao aumento das concentrações de IL-12 no 7º dia após a infecção. O tratamento com melatonina também resultou em um aumento nos níveis de IL-12 em todos os grupos (CM, CSHM, CORM, IM, ISHM, IORM), quando comparados aos grupos correspondentes não tratados (C, SH, OR, I, ISH, IOR). Quando a orquiectomia se somou ao tratamento com melatonina (IORM), obtiveram-se níveis significativamente mais elevados de IL-12 em relação a todos os outros grupos (Figura 14). Os níveis de IL-12 apresentaram-se mais elevados no início da infecção, chegando a um valor máximo no pico parasitêmico (7º dia) e diminuindo durante a evolução para fase crônica da doença (Figura 25).

4.13 Mortalidade

Não houve casos de mortes durante todo o período experimental.

5. DISCUSSÃO

Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo da doença de Chagas, o seu tratamento ainda continua apresentando muitos problemas, somando-se a isso o enorme número de pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi*. No tratamento de uma doença infecciosa ou parasitária é muito importante poder contar com um medicamento eficiente, capaz de realmente eliminar o agente causador e apresentando o mínimo de efeitos colaterais ao paciente.

Muitas drogas já foram testadas em animais experimentais infectados com *T. cruzi*, porém poucas foram testadas no homem até o momento, e com resultados pouco animadores. As drogas tripanossomicidas normalmente têm como mecanismo de ação a supressão da parasitemia, o que ocorre sobre a forma intracelular do parasita, tornando necessária a utilização de altas doses de medicamento, as quais, quase sempre tóxicas nessas concentrações, inviabilizam a utilização clínica. Dessa maneira, os centros de pesquisa buscam novas substâncias que possam auxiliar no combate à doença, sem interferir na qualidade de vida do paciente, o qual já está sob os efeitos maléficos da parasitose.

A visão deste trabalho foi voltada a uma terapêutica imunomoduladora, através da administração do hormônio melatonina, e a influência dos hormônios sexuais masculinos. Adotou-se como modelo experimental ratos da linhagem Wistar, já que os mesmos têm sido amplamente empregados para investigações sobre aspectos gerais da doença de Chagas experimental (MORENO et al., 2003; MORILLA et al., 2005; SANTOS et al., 2005; SANTELLO et al., 2007). A infecção nesse animal progride até a terceira semana, quando normalmente ocorre o óbito, ou então os animais passam para uma fase crônica, dependendo da patogenicidade da cepa. Nesse estudo não ocorreu mortalidade dos animais devido aos mesmos mostrarem relativa resistência à cepa Y de *T. cruzi.*

O primeiro parâmetro estudado foi a variação do peso corpóreo dos animais pertencentes a todos os grupos experimentais, com ênfase especial àqueles infectados tratados ou não com melatonina, concomitantemente ao efeito dos hormônios gonadais. Não se observou nenhuma variação significante de peso desses animais durante o processo evolutivo da infecção, mostrando que a administração de melatonina não interfere no crescimento do modelo experimental adotado (Tabela 2).

Ao se observar o resultado referente ao peso esplênico, comprovou-se a hiper-proliferação celular com conseqüente hipertrofia do órgão típica da fase aguda da doença de Chagas (PEREIRA et al., 2002). Todos os grupos infectados apresentaram um aumento

significativo no peso esplênico, quando comparados aos grupos não infectados, porém o tratamento com melatonina aliado à orquiectomia (grupo IORM) reduziu esta hipertrofia em relação ao outros grupos (Figura 2).

A atrofia tímica é comum em infecções agudas, onde se observa depleção intensa de linfócitos e apoptose massiva de timócitos, principalmente na região cortical do órgão. Isso é observado em doenças virais, como a AIDS, doenças causadas por parasitas, incluindo *T. cruzi*, *Plasmodium chaubi*, *Schistosoma mansoni* e também algumas causadas por fungos, como o *Histoplasma capsulatum* (SAVINO, 2006). Este perfil confirmou-se durante os experimentos, onde a infecção levou a uma atrofia do órgão, a qual, nos grupos tratados com melatonina não foi tão acentuada quanto nos grupos não tratados, mostrando mais uma vez a ação benéfica da melatonina, favorecendo o organismo hospedeiro (Figura 3).

A redução no número de parasitas sanguíneos em animais orquiectomizados confirma os dados previamente observados em estudos pioneiros de DO PRADO et al. (1998 e 1999) que demonstraram a ação da gonadectomia em *Calomys callosus* machos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* causou drástica redução da parasitemia em comparação aos animais não castrados. A ação da melatonina sobre a carga parasitária frente à infecção por *T. cruzi* já foi comprovada em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (SANTELLO et al., 2007). No sétimo dia após a infecção este efeito foi ainda maior, pelo tratamento com melatonina associado à orquiectomia, determinando ao grupo IORM o menor nível parasitêmico, em relação a todos outros (Figura 4).

A leucocitose observada na vigência da administração de melatonina durante a evolução da doença de Chagas experimental em ratos Wistar já havia sido demonstrada anteriormente (SANTELLO et al., 2007), porém neste novo estudo, observou-se também a influência dos hormônios sexuais masculinos sobre a infecção, mostrando uma otimização na resposta do hospedeiro, quando se soma: tratamento e orquiectomia (Figura 5).

O dimorfismo sexual representa um papel importante no direcionamento e evolução de distintas patogenias. As mulheres produzem resposta imune celular e humoral mais vigorosa do que os homens (BOUMAN, 2005), sendo mais resistentes às infecções causadas por diversos patógenos, como por exemplo, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* e *Giardia lamblia*, apresentando porém, algumas exceções, como *Toxoplasma gondii e Trichomonas vaginalis*, onde os homens são menos suscetíveis do que as mulheres (ROBERTS et al., 2001).

Cada vez mais, estudos científicos comprovam a importância dos hormônios sexuais como testosterona e estrógenos no desenvolvimento e regulação da resposta imune, atuando diretamente sobre as células de defesa e seus mediadores, como as citocinas. Alguns trabalhos já ressaltaram a importância dos hormônios sexuais na evolução da doença de Chagas (WICHMANN et al., 1996; DO PRADO et al., 1998 e 1999; ANGELE et al., 1999 e 2000; BOUMAN et al., 2005; MARRIOTT & HUET-HUDSON, 2006).

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes modalidades de resposta imune direcionando-as de modo específico contra o parasita. O desenvolvimento da resposta imune é importante na redução da carga parasitária e é considerado o principal ponto de defesa responsável pelo controle da fase aguda da infecção.

Inúmeras pesquisas fundamentadas na relação entre sistema endócrino e imune demonstram que enquanto a testosterona exerce efeito imunossupressor (GROSSMAN, 1985; ALEXANDER & STIMSON, 1988; OLSEN & KOVACS, 1996; LINDSTRÖM et al., 2001), os estrógenos além de possuírem efeito positivo sobre a resposta imune específica e inespecífica, apresentam também propriedades antiinflamatórias e poderosa ação anti-oxidante, protegendo os tecidos de danos causados pelos radicais livres (ANGELE et al., 1999 e 2000; SENER et al., 2005; MARRIOTT & HUET-HUDSON, 2006).

A ação supressora da testosterona, somada ao efeito do tratamento com melatonina, sobre células de defesa do organismo foi observada mediante os resultados obtidos na contagem global de macrófagos peritoniais e na contagem de leucócitos totais, sugerindo que na ausência do hormônio masculino, através da orquiectomia, houve aumento no número dessas células, quando comparados aos animais não tratados, intactos e sham (Figura 5 e Tabela 3).

Estudos afirmam que a resistência às infecções causadas por parasitas intracelulares está fortemente associada à ativação de macrófagos e posterior produção de óxido nítrico por essas células. Após a apresentação do antígeno por células específicas, os linfócitos Th (CD4+) e NK proliferam-se, liberando citocinas, como o IFN-γ, que agirão sobre os macrófagos ativando-os, resultando na expressão da enzima óxido nítrico sintetase e conseqüente produção de óxido nítrico, muito eficaz no controle da replicação do parasita (ST PIERRE et al., 1995) (Tabela 3 e Figuras 6 e 7). O óxido nítrico é considerado um importante mediador da atividade microbicida não apenas dos macrófagos, mas de outras células com atividade fagocítica (FIERRO et al., 1999).

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam essa afirmativa, pois os animais orquiectomizados tratados, que demonstraram maior resistência à infecção por *T. cruzi*, como observado pela da redução na parasitemia em relação aos animais intactos e sham, apresentaram forte indução na produção de NO por macrófagos estimulados (Figuras 6 e 7).

Outro dado relevante obtido nesse experimento foi a linfoproliferação de timócitos e esplenócitos frente ou não ao tratamento com melatonina somado ou não aos efeitos dos hormônios gonadais. Este estudo permitiu observar que os animais tratados infectados apresentaram valores estatisticamente significantes maiores na proliferação celular em relação aos não tratados, durante todos os dias de experimento. O grupo orquiectomizado infectado tratado (IORM) apresentou as maiores taxas de proliferação. Em relação ao estímulo por concanavalina observou-se aumento da blastogênese celular, seguindo o mesmo perfil dos grupos não estimulados. O tratamento com melatonina favoreceu a proliferação e a sensibilidade celular ao agente mitogênico (Figuras 8 e 9).

Inúmeros trabalhos têm definido a importância das sub-populações de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ junto à imunidade celular, na infecção experimental pelo *T. cruzi* (HOFT et al., 2000, PADILLA et al., 2007). As células T são estimuladas pela IL-1 e por sinais coestimuladores a produzir IL-2. Sob influência da IL-2, as células T CD4+ e CD8+ expandem-se clonalmente e se diferenciam em células efetoras, as quais induzem a resposta contra o hospedeiro. Essas células efetoras são ativadas por coestimuladores e citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ e IL-12, em células efetoras Th1 (incluindo linfócitos T helper CD4+ e citotóxicos CD8+) (FARIA et al., 2008).

As células $CD4^+$ são importantes na proteção contra a infecção por *T. cruzi*, já que induzem a produção de anticorpos líticos e produzem citocinas como IFN-γ, que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasita (TARLETON et al., 1996). Já as células $CD8^+$ participam na imunidade e patogênese chagásica humana, principalmente nos mecanismos envolvendo citólise e fibrose que levam à destruição da miofibra cardíaca na cardiopatia chagásica (CUNÃ & CUNÃ, 1995). Devido a estes fatos, o perfil populacional de linfócitos T $CD4^+CD3^+$ e $CD3^+CD8^+$ observado nos experimentos é muito satisfatório, já que ocorreu um aumento na porcentagem destas células em todos os grupos tratados com melatonina, com o grupo orquiectomizado tratado apresentando os maiores valores (Figuras 10 e 11).

Inúmeros são os relatos na literatura de comprometimento cardíaco envolvendo a presença de infiltrado inflamatório, eventual destruição de fibras, bem como a presença de ninhos de amastigotas e elevação no peso cardíaco em função da hipertrofia do órgão, durante a infecção chagásica em ratos *Wistar* (SANTOS et al., 2005; SANTELLO, 2007; SANTOS et

al., 2007; FILIPIN et al., 2008; BRAZÃO et al., 2009). Também já foi observado que o tratamento com melatonina é capaz de reduzir em tamanho e número os ninhos de amastigotas, além de prevenir a desorganização tecidual e a formação de infiltrados inflamatórios, no mesmo modelo experimental (SANTELLO et al., 2007). Estas observações podem ser somadas aos efeitos sobre as células T $CD3^{+}CD8^{+}$ descritos anteriormente, evidenciando que os efeitos do tratamento da melatonina associados à orquiectomia poderiam agir sobre vários processos endógenos durante o desenvolvimento da doença de Chagas.

Na avaliação das alterações cardíacas dos grupos experimentais deste trabalho, observamos que os animais infectados orquiectomizados (IOR) apresentaram peso cardíaco menor em relação aos grupos intacto (I) e sham (ISH), e esta redução foi mais significativa no grupo infectado orquiectomizado tratado com melatonina (IORM) (Figura 1). Os mesmos grupos mostraram diminuição no número de ninhos amastigotas, que também eram menores em tamanho, quando comparados aos dos animais infectados não submetidos cirurgia e sham (Tabela 4 e Figuras 15, 16 e 17). Isso deve estar relacionado ao menor número de parasitas circulantes evidenciado anteriormente (Figura 4), que proporcionou uma reduzida presença de amastigotas nos órgãos-alvo do hospedeiro.

ABBAS et al. (2005) descreve que após a infecção por um determinado agente, ocorre o processo de reconhecimento do antígeno pelas células imuno-competentes. Em seqüência os linfócitos B ativados migram para as diferentes partes do baço, além da ativação de células plasmocitárias, induzindo a produção de anticorpos, resultando na hipertrofia do órgão devido a hiper-proliferação celular.

Os estudos sobre os efeitos imunológicos das doenças infecciosas, já deixaram bem evidenciado que, durante a evolução dessas patologias, ocorrem várias mudanças tanto nas células sanguíneas como nos órgãos linfóides (SAVINO, 2006). A grande maioria das doenças causadas por agentes patológicos leva a um desequilíbrio da resposta imune, onde um estado de imunossupressão normalmente se instala, de modo a proporcionar ao parasita, condições de evasão da resposta imune do hospedeiro. Podemos dizer que durante a fase aguda das tripanossomíases, tanto africana como americana, ocorre uma diminuição das funções das células T-auxiliares, citotóxicas, bem como das células B (SZTEIN & KIERZENBAUM, 1993).

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e estão envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com a imunopatologia na doença de Chagas. O IFN-γ tem sido considerado, por alguns autores, como uma citocina protetora, uma vez que, ao estimular macrófagos, estes produzem metabólitos tóxicos para o parasita. Por outro lado, IL-4, IL-10 e TGF-β1 são capazes de suprimir a ativação dos macrófagos induzida por IFN-γ, inibindo tanto a liberação dos metabólitos tóxicos quanto a diferenciação das células Th1 (BRODSKYN & BARRAL NETO, 2000), sendo consideradas, portanto, citocinas antiinflamatórias.

A terapia com melatonina modulou a produção das citocinas avaliadas neste estudo, principalmente quando associada à orquiectomia, promovendo um aumento das citocinas que atuam sobre a resposta Th1 e controlando os níveis das citocinas antiinflamatórias durante a fase aguda da doença, não impedindo que as concentrações destas últimas aumentassem com a evolução da doença, regulando o balanço Th1/Th2, favorecendo positivamente a resposta imune do hospedeiro. Algumas destas ações do tratamento isolado da melatonina já haviam sido mostradas em trabalhos anteriores (SANTELLO et al., 2007; SANTELLO et al., 2008a; SANTELLO et al., 2008b), porém a associação à orquiectomia é inédita, e mostrou que os hormônios masculinos realmente interferem de forma negativa na resposta imune contra parasitas.

Com relação às citocinas envolvidas na resposta Th1, como TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6 e IL-12 (Figuras 19, 20, 21, 24 e 25), o tratamento com melatonina associado à orquiectomia levaram a um aumento em seus níveis, no início da infecção, alcançando seu máximo no pico parasitêmico (7º dia); níveis estes que decresceram com a aproximação da fase crônica. O grupo infectado orquiectomizado tratado (IORM) mostrou as maiores diferenças, quando comparado aos demais. O contrário foi observado com os níveis de citocinas antiinflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF-β1 (Figuras 18, 22 e 23), as quais são importantes na instalação da resposta Th-2 ao parasita. Os grupos tratados com melatonina apresentaram níveis menores em relação aos grupos não tratados, durante todos os dias experimentais, porém os valores foram aumentando com a aproximação da fase crônica. O grupo orquiectomizado tratado com melatonina apresentou os menores níveis. O efeito modulador da melatonina sobre as citocinas IL-4, IL-10 e TGF-β1 já havia sido demonstrado em estudos prévios (SANTELLO et al., 2008b), mas a associação e estudo da relação com os hormônios sexuais masculinos não haviam sido testados, e ficou muito evidente o efeito do tratamento e a interferência hormonal no equilíbrio do balanço Th1/Th2, possibilitando uma resposta mais

efetiva e sincronizada frente ao parasita, o que pode explicar os outros resultados satisfatórios deste estudo.

Trabalhos pioneiros no nosso laboratório já comprovaram que a administração de uma substância imunoestimulatória, como o DHEA e a melatonina, durante a fase aguda da doença aprimora as funções imunes do hospedeiro e resulta em maior resistência contra o parasita, diminuindo o desequilíbrio causado pela infecção (SANTOS et al., 2005; CAETANO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; SANTELLO et al., 2007; BRAZÃO et al., 2007; SANTELLO et al, 2008a, SANTELLO et al,, 2008b; BRAZÃO et al., 2008). Em um destes estudos, realizado por FILIPIN, et al. (2008), foi avaliada a interação sinérgica do DHEA e da orquiectomia, onde se constatou melhoria na resposta imune contra parasita, nos animais que receberam o referido hormônio e passaram pelo processo de castração.

A ação sinérgica observada entre a orquiectomia e a adição de melatonina é um dado inédito, comprovado pela observação e análise dos parâmetros analisados tais como redução da parasitemia, imunoestimulação conseqüentemente provocando um aumento nas concentrações de NO, IL-2, IL-12 e número de macrófagos. Esta ação sinérgica da orquiectomia e tratamento com melatonina comprova que a ausência de testosterona foi marcante no destino da infecção, ficando sob a regência da melatonina o desencadeamento e afinidade de todos os fenômenos imunoestimuladores que controlaram a replicação parasitária.

Desta maneira, por meio dos resultados obtidos, foi possível constatar que a utilização do hormônio melatonina, associado ou não, à influência dos hormônios sexuais masculinos durante a infecção experimental, forneceu perspectivas para possíveis terapias efetivas no tratamento da doença de Chagas, comprovando a marcante influência do tratamento com melatonina no desenvolvimento da fase aguda da infecção.

A busca por terapias eficazes no tratamento da doença de Chagas deve ser incansável e incessante. Dessa maneira, os dados encontrados até o momento, com a utilização da melatonina revelam seu potencial efeito imunoestimulador, minimizando as conseqüências patológicas que normalmente ocorrem na fase tardia da doença.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem inferir algumas observações sobre a administração de melatonina via oral a ratos Wistar infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, associada ou não à ação dos hormônios sexuais masculinos sobre a doença de Chagas experimental:

- O peso corpóreo não sofreu alterações significativas;
- O peso cardíaco e esplênico foi maior nos grupos infectados em relação aos grupos sem infecção. Os animais infectados orquiectomizados e tratados com melatonina apresentaram menor peso;
- Houve diminuição do peso do timo nos grupos infectados em relação aos grupos sem infecção. Notou-se menor atrofia em animais orquiectomizados tratados com melatonina;
- Houve diminuição drástica do número de tripomastigotas sangüícolas na fase aguda da infecção;
- Observou-se um aumento do número de leucócitos totais durante a evolução da doença, na vigência de orquiectomia e tratamento com melatonina,
- Observou-se, igualmente, um aumento no número de macrófagos peritoniais nos animais infectados tratados com melatonina, onde o grupo orquiectomizado apresentou os valores mais elevados;
- O grupo infectado orquiectomizado tratado com melatonina, mostrou elevada concentração de óxido nítrico;
- A orquiectomia e o tratamento com melatonina induziram um aumento significante na taxa de proliferação de timócitos e esplenócitos;
- Utilizando-se a citometria de fluxo observou-se uma maior porcentagem das populações de linfócitos T $CD4^+$ $CD3^+$ e de linfócitos T $CD8^+$ $CD3^+$;
- O exame histológico revelou um menor parasitismo nas fibras cardíacas de animais orquiectomizados e tratados com melatonina;
- As concentrações das citocinas analisadas (TGF-β1, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, IL-6 e IL-12) demonstraram um efeito imunoestimulador, culminando em um balanço positivo nas respostas Th1/Th2.

De uma maneira geral pode-se concluir que a terapia com melatonina exerceu um papel imunomodulador sobre todos os parâmetros avaliados neste experimento e a

orquiectomia (ausência de esteróide gonadais) contribuiu no processo de imunomodulação positiva, exercendo um papel sinérgico no direcionamento da resposta do hospedeiro no intuito de controlar não apenas a replicação parasitária, mas também os efeitos patológicos deletérios da doença de Chagas experimental.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas KA, Lichtman AH. Imunologia Celular e Molecular, 5ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.308-326.

Abrahamsohn IA, Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol, 1995; 155(8):3955-3963.

Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effetc of murine-actived macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen from L-arginine. J Immunol, 1990; 144(7):2725-2729.

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(3):279-287.

Alcina A, Fresno M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol, 1987; 9(2):175-186.

Alexander J, Stimson WH. Sex hormones and the course of parasitic infection. Parasitol Today, 1988; 4:189-193.

Aliberti JCS, Cardoso MAG, 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 trypomastigotes. Infection and Immunity, 1996; 64(6):1961-1967.

Amato-Neto V. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. Tratamento Específico da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi.* Arq Bras Cardiol, 1998; 70(1):63-64.

Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM. Caracterização morfobiológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi.* Gaz Med Bahia, 1970; 70:32-42.

Angele MK; Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. Am J Physiol, 1999; 277:35-42.

Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, Chaudry IH. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. Shock, 2000; 14(2): 81-90.

Auger, S, Storino R, Iglesias Ordoñez O, Urrutia MI, Sanmartino M, Romero D, Jörg M. Emergencies in patients with Chagas' disease in Buenos Aires city, Argentina. Rev Soc Bras Med Trop, 2002; 35(6):609-616.

Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. J Immunol, 1998; 160(3):1191-1197.

Benten WP, Guo Z, Krücken J, Wuerlich F. Rapid effects of androgens in macrophages. Steroids, 2004; 69:585-590.

Bergeron M, Olivier M. *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. J Immunol, 2006; 177(9):6271-6280.

Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. J Neural Transm, 1986; 21:433-449.

Bloom W, Fawcett DW. Pineal Gland. In: A Textbook of Histology. 2ªed, Chapman & Hall, 1986. p.516-524.

Borges MM, Andrade SG, Pilatti CG, Prado Jr 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(4):493-502.

Borges MM, Mello DA, Teixeira ML. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. Rev Saúde Pública, 1982; 16:233-242.

Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. Human Reproduction Update, 2005; 11(4):411-423.

Brand T, Tobie EJ, Kissling RE. Adams G. Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. J Infect Dis, 1949; 85(1):5-16.

Brazão V, Caetano LC, Del Vecchio Filipin M, Toldo MP, Caetano LN, do Prado Jr JC. Zinc supplementation increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. Vet Parasitol, 2008; 154(1-2):32-37.

Brazão V, Del Vecchio Filipin M, Caetano LC, Toldo MP, Caetano LN, do Prado Jr JC. *Trypanosoma cruzi*: the effects of zinc supplementation during experimental infection. Exp Parasitol, 2008; 118(4):549-554.

Brazão V, Caetano LC, Filipin MDV, Santello FH, Toldo MP, do Prado Jr JC. Trypanosoma cruzi: The effects of zinc supplementation in the immune response during the course of experimental disease. Exp Parasitol, 2009;121(1):105-109.

Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1963; 5(5):220-224.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1962; 4:389-396.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ªed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.55-56.

Brito MM, Pires MQ, Pacheco RS. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. Kinetoplastide Biology and Disease, 2003; 2(1):17.

Brodskyn CI, Barral-Neto M. Resposta Imune Humana na Doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (Orgs). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.170-176.

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(6):1407-1410.

Caetano LC, Zucoloto S, Kawasse LM, Toldo MP, do Prado JC. Influence of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in the depletion of esophageal neurons in *Calomys callosus*. Dig Dis Sci, 2006; 51(10):1796-1800.

Cajochen C, Kräuchi K, Wirz-Justice A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. J Neuroendocrinol, 2003; 15(4):432-437.

Caldeira JC, Franci CR. Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. Brain Res Bulletin, 2000; 52(6):483-489.

Camargos ERS, Franco DJ, Garcia CMMG, Dutra AP, Teixeira Junior AL, Chiari E, et al. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. Am J Trop Med Hyg, 2000; 62(5):604-612.

Campos MA, Gazzinelli RT. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm, 2004; 13(3):139-143.

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(1):128-134.

Cardoni RL, Antúnez MI. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Mediators Inflamm, 2004; 13(4):235-240.

Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. Cell Mol Life Sci, 2003; 60(10):2272– 2278.

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(3):537-539.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. Endocrine, 2005; 27(2):189-200.

Castro MAP, Brener Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop, 1985; 18:233-239.

Cavallo A. Plasma melatonin rhythm in disorders of puberty: interactions of age and puberal stages. Horm Res, 1991; 36(1-2):16-21.

Chagas E. Infection expérimental de I'home par le *Trypanosoma cruzi*. Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales, 1933; 115:1339-1341.

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(5):3193-3200.

Coura JR, Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002; 97(1):3-24.

Cunã WR, Cunã CR. Characterization of T cell clones from chagasic patients with pathology. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1995; 90(4):503-506.

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity, 2006; 39(1):41-54.

Cutando A, Silvestre FJ. Melatonin: implications at the oral level. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol, 1995; 8(3-4):81-86.

Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. Lupus, 2004; 13(9):635-638.

Da Silva, JA. Sex hormones and glucocorticoids: Interactions with the immune system. Ann New Y Acad Sci, 1999; 876:102-118.

Delagrange P, Atkinson J, Boutin JA, Casteilla L, Lesieur D, Misslin R, Pellissier S, Pénicaud L, Renard P. Therapeutic perspectives for melatonin agonists and antagonists. J Neuroendocrinol, 2003; 15(4):442-448.

Dias JC. Epidemiological surveillance of Chagas disease. Cad Saude Publica, 2000; 16(2):43-59.

Dias JC. Notes about of Trypanosoma cruzi and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. Rev Soc Bras Med Trop, 2006; 39(4):370-375.

Do Prado JC Jr, Levy AMA, 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(10):826-829.

Do Prado júnior JC, Leal MP, Anselmo-Franci JA, de Andrade júnior HF, Kloetzel JK. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female Callomys callosus infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res, 1998; 84(2):100-105.

DosReis GA, Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Lopes MF. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. Trends Parasitol, 2005; 21(5):237-243.

Dos Santos CD, Toldo MP, do Prado Junior JC. *Trypanosoma cruzi:* the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. Acta Trop, 2005; 95(2):109-115.

Dost CK, Albuquerque S, Hemleben V, Engels W, Prado Jr JC. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. Parasitol Res, 2002; 88(7):609-616.

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(1):49-55.

Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not MT1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. Neuroendocrinology, 2001; 74(3):178-184.

Dubocovich ML, Takahashi JS. Use of 2-[^{125} I] iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987; 84(11):3916-3922.

Dubocovich ML. Characterization of a retinal melatonin receptor. J Pharmacol Exp Ther, 1985; 234(2):395-401.

Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? Trends Pharmacol Sci, 1995; 16(2):50-56.

Eidinger D, Garrett TJ. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. J Exp Med, 1972; 136(5):1098-1116.

El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. Pharmacol Res, 2002: 46(3):235-243.

El-Sokkary GH, Reiter RJ, Abdel-Ghaffar SKH. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thimic lymphocytes of old rats. Neuro Endocrinol Lett, 2003; 24(3-4):215-223.

Evans TG, Reed SS, Hibbis JB Jr. Nitric oxide production in murine *Leishmaniasis*: correlation of progressive infection with increase in systemic synthesis of nitric oxide. Am J Trop Med Hyg, 1996; 54(5):486-489.

Faas M, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, De Leij L, Schuiling G. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? Fertil Steril, 2000; 74(5):1008-1013.

Faria BA, Silva SM, Abreu MTCL, Napimoga MH. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes**.** Rev Bras Hematol Hemoter, 2008; 30(4):309-315.

Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002; 97(4):443-457.

Fierro IM, Nascimento-Dasilva V, Arruda MA, Freitas MS, Plotkowski MC, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. J Leukoc Biol, 1999; 65(4):508-514.

Filipin MdelV, Brazão V, Caetano LC, Santello FH, Toldo MP, Caetano LN, do Prado JC Jr. *Trypanosoma cruzi:* orchiectomy and dehydroepiandrosterone therapy in infected rats. Exp Parasitol, 2008; 120(3):249-254.

Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Méd Brás, 2002; 46(3):265-271.

Galvão da Silva AP, Jacysyn JF, De Almeida Abrahamsohn I. Resistant mice lacking interlekin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. Immunology, 2003; 108(2):230-237.

Garcia ES, Dvorak JA. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. Am J Trop Med Hyg, 1982; 31(2):259-262.

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. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005; 49(4):1521-1528.

Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrilo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL12 production. Life Sci, 1999; 65(20):2143-50.

Gattass CR, Lima MT, Nobrega AF, Barcinski MA, Dos Reis GA. Do self-heart-reactive T cells expand in *Trypanosoma cruzi*-immune hosts? Infect Immun, 1998; 56(5):1402-1405.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. 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 grow factor-beta. Eur J Immnol, 1992; 22(10):2501-2506.

Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, Leite-de-Moraes M, Dy M, Arnal JF, Bayard F, Herbelin A. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. Blood, 2005; 105(6):2415-2420.

Green LC, Wagner DA, Glogowsk J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 1982; 126(1):131-138.

Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. Science, 1985; 227(4684):257-261.

Gulcin I, Buyukokuoglu ME, Oktay M, Kufrevioglu OI. On the in vitro antioxidative properties of melatonin. J Pineal Res, 2002; 33(3):167-171.

Hoffman RA, Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. Anat Rec, 1965; 153(1):19-21.

Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 2000; 68(1):197-204.

Hruby Z, Beck KF. Cytotoxic effect of autocrine and macrophages – derived nitrite oxide on cultured rat mesangial cell. Clin Exp Immunol, 1997; 107(1):76-82.

Hyland KV, Engman DM. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. Trends in Parasitol, 2006; 22(30):101-103.

James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. Microb Rev, 1995; 59(4):533-547.

Jimerson DC, Lynch HJ, Post RM, Wurtman RJ, Bunney WE Jr. Urinary melatonin rhythms during sleep deprivation in depressed patients and normals. Life Sci, 1977; 20(9):1501-1505.

Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. The J Allergy Clin Immunol, 1999; 103:282-288.

Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. Clin Exp Immunol, 1996; 106(2):410-415.

Kang J, Ahn M, Kim Y, Moon C, Lee Y, Wie MB, Lee YJ, Shin T. Melatonin ameliorates autoimmune encephalomyelitis through suppression of intercellular adhesion molecule-1. J Vet Sci, 2001; 2(2):85-89.

Kappers JA, Smith AR, Vries RAC. The mammalian pineal gland and its control of hipothalamic activity. In: Swaab DF, Schade JP (Eds.). Progress in brain research. Amsterdam: Elsevier, 1974. p.149-174.

Klein DC. The pineal gland: a model of neuroendocrine regulatoin. In: Reichlin, S.; Baldessarini RJ, Martin JB (Eds.). The hypothalamus. New York: Raven Press, 1978. p.303-327.

Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. Parasite Immunol, 2004; 26(6-7):247-264.

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

Kumar S, Tarleton RL. Antigen-Specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Immunol, 2001; 166(7):4596-4603.

Laguens RP, Meckert PMC, Vigiliano CV. Patogenia de la miocarditis chagásica crônica humana. Medicina (Buenos Aires), 1999; 59(2):63-68.

Lener AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc, 1958; 80(10):2587.

Lewy AJ, Wehr T, Goodwin F, Newsome D, Markey S. Light suppresses melatonin secretion in humans. Science, 1980; 210(4475):1267-1269.

Lewy AJ. Biochemistry and regulation of mammalian melatonin production. In: Relkin R (Ed.). The pineal gland. New York: Elsevier Biomedical, 1983. p.77-128.

Liew FY, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. Eur J Immunol, 1991; 21(12):3009-3014.

Lindström KM, Krakower D, Lundström JO, Silverin B. The effects of testosterone on a viral infection in greenfinches (*Carduelis chloris*): an experimental test of the immunocompetence-handicap hypothesis. Proc Biol Sci, 2001; 268(1463):207-211.

Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. Nat Immun, 1998; 16(1):1-5.

Lopes ER. Resposta inflamatória na fase crônica da forma adquirida da Doença de Chagas. Rev Patol Trop, 2002; 31(1):23-59.

Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Rubio A, Goberna R, Gerrero JM. Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rat. Life Sci, 1991; 48(12):1165-1173.

Maestroni GS, Conti A, Pierpaoli W. Pineal melatonin: its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. Ann N Y Acad Sci, 1988; 521:140-148.

Maestroni GJ. The photoperiod transducer melatonin and the immune hematopoietic system. J Photochem Photobiol B, 1998; 43(3):186–192.

Maestroni GJ. Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases, and cancer. Adv Exp Med Biol, 1999; 467:217– 226.

Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. Expert Opin Investig Drugs, 2001; 10(3):467-476.

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(3-4):232-243.

Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. Immunol Res, 2006; 34(3):177–192.

Martins EJ, Fernandes LC, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumor-bearing rats. J Neuroimmunol, 1998; 82(1):81-89.

Mcmurray RW, Suwannaro S, Ndebele K, Jenkins JK. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. Pathobiology, 2001; 69(10:44-58.

Melnikov VG, Velasco FF, Espinoza Gómez F, Rodríguez FG, Dobrovinskaya OR. Pathologic changes in lungs caused by Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mice. Am J Trop Med Hyg, 2005; 73(2):301-306.

Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J Parasitol, 1978. 64(3):475-482.

Miller GE, Cohen S, Ritchey AK. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. Health Psychol, 2002; 21(6):531-541.

Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. FASEB J, 1995; 9(13):1319-1330.

Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. Handb Exp Pharmacol, 2006; 176: 213-254.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophisiology and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991; 43(2):109-242.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol, 2006; 100(8):663-677.

Moore RY. Mecanismos neuroendócrinos – células e sistemas. In: Yen SCC, Jaffe RB (Eds.). Endocrinologia Reprodutiva, 1990. Rocca. p.19-20.

Moreno EA, Rivera IM, Moreno SC, Alarcon ME, Lugo-Yarbuh A. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of infection. Invest Clin, 2003; 44(3):241-254.

Morgan PJ, Barrett P; Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. Neurochem Int, 1994; 24(2):101-46.

Morilla MJ, Prieto MJ, Romero EL. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005; 100(2):213-219.

Morrey KM, Mclachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. J Immunol, 1994; 153(6):2671-2680.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J, 1992; 6(12):3051-3064.

Niles LP. High-affinity binding sites for melatonin in hamster spleen. Med Sci Res, 1989; 17:179-183.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem, 2000; 275(40):31311-31317.

Oliveira JS. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. Am Heart J, 1995; 110(5):1092-1098.

Oliveira MA, Santiago HC, Lisboa CR, Ceravollo IP, Trinchieri G, Gazzinelli RT, Vieira LQ. *Leishmania sp*: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. Exp Parasitol, 2000; 95(2):96-105.

Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. Endoc Rev, 1996; 17(4):369-384.

Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? Parasitol Today, 2000; 6(1):18-23.

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(1):231-235.

Page ST, Plymate SR, Bremner WJ, Matsumoto AM, Hess DL, Lin DW, Amory JK, Nelson PS, Wu JD. Effect of medical castration on CD4+CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-γ expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006; 290(5):856-863.

Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. Ann Trop Med Parasitol, 2000; 94(6):571-579.

Pang SF, Yuan H, Yu ZH, Wang XL, Tang PL, Yau MYC, Lee PPN. Melatonin binding sites in the nervous and immune systems. In: Franschini F, Reiter RJ (Eds.). Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation. Plenum Press, New York, 1991. p.107.

Pereira SA, Rodrigues DB, Castro EC, Dos Reis MA, Teixeira Vde P. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas'disease. Am J Trop Med Hyg, 2002; 66(4):401-403.

Perlow MJ, Reppert SM, Tamarkin L, Wyatt RJ, Klein DC. Photic regulation of the melatonin rhythm: monkey and man are not the same. Brain Res, 1980; 182(1):211-219.

Persengiev S, Usheva A, Kanchev L. Biochemical characteristics of melatonin receptors in different organs and translation of hormonal signal in the nucleus. In: Franschini F, Reiter RJ (Eds.). Role of melatonin and pineal peptides in neuroimmunomodulation. Plenum Press, New York, 1991. p.137.

Pinto Dias JC. Natural history of Chagas' disease. Arq Bras Cardiologia, 1995; 65(4):359-366.

Plata F, Wietzerbin, J, Garcia-Pons F. Synergistic protection by specific antibodies and interferon aganist infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. Eur J Immunol, 1984; 14:903-905.

Plata F, Garcia-Pons F, Wietzerbin J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. Ann Inst Pasteur Immunol, 1987; 138(3):397-415.

Queiroz SL, Batista AA. Funções biológicas do óxido nítrico. Química Nova, 1999; 22(9):584-590.

Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Harmouch A, García-Mauriño S, Guerrero JM.. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. J Neuroimmunol, 1998; 8(2):190-197.

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

Reichlin S. The pineal gland. In: Wilson JD, Foster DW (Eds.). Williams textbook of endocrinology. 8th. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p.240-253.

Reiter RJ, Robinson J. Melatonina. Rio de Janeiro: Record, 1996.

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerijneck E, Poeggler B, Barlow-Walder LR, Chuang JI, Ortiz GG, Accunã-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as anti-oxidant. J Pineal Res, 1995; 18(1):1-11.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. Endocr Rev, 1991; 12(2):151-180.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron, 1994; 13(5):1177-1185.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995; 92(19):8734–8738.

Reyes C. La Glándula Pineal Y Órganos Circunventriculares. In: Treviño AZ, et al. Fundamentos de neuroendocrinologia. 1ed. México, 1993. p.53-72.

Ribeiro-Dos-Santos R, Rassi A, Köberle F. Chaga's disease. In: Schonfeld, H. (Ed.), Antiparasitic Chemoterapy. S. Karger, Basel, 1981. p.115-134.

Roberts WC, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. Clin Microbiol Rev, 2001; 14(3):476-488.

Rodríguez-Bonfante C, Amaro A, García M, Mejías Wohlert LE, Guillen P, Antonio García R, et al. Epidemiology of Chagas disease in Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: triatomine infestation and human seroprevalence. Cad Saude Publica, 2007; 23(5):1133-1140.

Rossi MA. Bestetti RB. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. Cardiology, 1995; 86(1):1-7.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol, 2002; 3(11):1041-1047.

Saltzman BE. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in the atmosfere. Anal Chemis, 1954; 26:1949-1955.

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(4):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(1):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(3):291-296.

Santos CD, Caldeira JC, Toldo MP, Prado JC. *Trypanosoma cruzi*: Effects of repetitive stress during the development of experimental infection. Exp Parasitol, 2005; 110(2):96-101.

Santos CD, Levy AM, Toldo MP, Azevedo AP, Prado JC Jr. Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Vet Parasitol, 2007; 143(3-4):222-228.

Santos CD, Toldo MPA, Levy AM, Kawasse LM, Zucoloto S, do Prado JC Jr. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. Acta Tropica, 2007; 102(3):143-150.

Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. PLoS Pathog, 2006; 2(6):0472-0483.

Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-Da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki Mdel P, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity *to Trypanosoma cruzi*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007; 18(1-2):107-124.

Schuster JP, Schaub GA. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. Parasitol Res, 2001; 87(12):994-1000.

Scorza C, Scorza JV. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty- ninth days after inoculation. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1972; 14(3):171-177.

Seiki K, Sakabe K. Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. Arch Histol Cytol, 1997; 60(1):29-38.

Sener G, Arbak S, Kurtaran P, Gedik N, Yegens BC. Estrogen protects the liver and intestines against sepsis-induced injury in rats. J Surg Res, 2005; 128(1):70-78.

Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folha Clínica Biol. São Paulo, 1953. 20:191-203.

Silver RM, Branch DW. Autoimmune disease in pregnancy-Systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Clin Perinatol, 1997; 24(2):291-322.

Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects. Neuro Endocrinol Lett, 2002; 23(1):61-66.

Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. Biochemistry (Mosc), 2001; 66(1):19-26.

Sogayar R, Kipnis TL, Curi PR. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1993; 35(5):395-398.

Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Perumal SR, Miller SC. Melatonin, immune function and aging. Immun Ageing, 2005; 29(2):17.

St Pierre BA, Granger DA, Wong JL, Merrill JE. A study on tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors, and nitric oxide in human fetal glial cultures. Adv Pharmacol, 1995; 34:415-438.

Sztein MB, Kierszenbaum F. Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infection. Parasitol Today, 1993; 9(11):424-428.

Taliaferro W, Pizzi T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. J Infect Dis, 1955; 96(3):199-226.

Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. J Pineal Res, 2003; 34(1):75-78.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. Clin Microbiol Rev, 1992; 5(4):400-419.

Tanriverdi F, Silveira LF, Maccoll GS, Bouloux PM. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. J Endocrinol, 2003; 176(3):293-304.

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both Class I- and Class II restricted T cells in immune resistance and disease. Int Immunol, 1996; 8(1):13-22.

Terenzi F, Diaz-Guerra MJM, Casado M, Hortelano S, Leoni S, Boscá L. Bacterial lipopetides induce nitric oxide syntetase and promote apoptosis throught nitric oxide – independent pathways in rats macrophages. J Biol Chem, 1995; 270(11):6017-6021.

Thomson L, Gadillha FR, Peluffo G, Vercesi AE, Radi R. Peroxynitrite affects Ca 2+ transport in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 1999; 98(1):81-91.

Toledo MJO, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Alves CF, et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. J Antimicrob Chemother, 2004; 53(6):1045-1053.

Torrico F, Heremans H, Ribera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Immunol, 1991; 146(10):3626-3632.

Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflamation and immunity. Adv Immunol, 1998; 70:83-243.

Trischmann TM. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. Parasite Immunol, 1984; 6(6):561-570.

Uyemura AS, Albuquerque S, Curti C. Energetics of heart mitochondria during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. Inst J Biochem Cell Biol, 1995; 27(11):1183-1189.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Pública, 2000; 16(2):7-12.

Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. Cell Tissue Res, 2002; 309(1):151-62.

Walsh CJ, Stuckey JE, Cox H, Smith B, Funke C, Stott J, Colle C, Gaspard J, Manire CA. Production of nitric oxide by peripheral blood mononuclear cells from the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. Vet Immunol Immunopathol, 2007; 118(3-4):199-209.

Wang H, Wang Z, Chen J, WU J. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF-kappaB, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes. Cell Biol Int, 2007; 31(9):1027-1035.

Webley GE, Leidenberger F. The circadian pattern of melatonin and its positive relationship with progesterone in women. J Clin Endocrinol Metab, 1986; 63(2):323-328.

Weetman AP, Mcgregor AM, Smith BR, Hall R. Sex hormones enhance immunoglobulin synthesis by human peripheral blood lymphocytes. Immunol Lett, 1981; 3(6):343-346.

Weinberg U, D'Eletto RD, Weitzman ED, Erlich S, Hollamder CS. Circulating melatonin in man: episodic secretion through-out the light-dark cycle. J Clin Endocrinol Metab, 1979; 48(1):114-118.

Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. J Immunol, 1984; 132(2):656-661.

Wetterburg L, Arendt J, Paunier L, Sigonenko PC, Vandonselaar W, Heyden T. Human serum melatonin changes during the menstrual cycles. J Clin Endocrinol Metab, 1976; 42(1):185-188.

Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. Nature Immunol, 2001; 2:777-780.

WHO 2003. Control of Chagas Disease. Report of WHO Expert Committee, WHO Technical Report Series n 811, Geneva, 95 pp.

Wichmann MW, Zellweger R, Demaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Mechanism of immunosuppression in males following trauma-hemorrhage. Critical role of testosterone. Arch Surg, 1996; 131(11):1186-1191.

Witt-Enderby PA, Benett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. Life Sci, 2003; 72(20):2183-2198.

Wong JM, Billiar TR. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. Adv Pharmacol, 1995; 34:155-170.

Yie SM, Niles LP, Younglai EV. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. J Clin Endocrinol Metab, 1995; 80(5):1747-1749.

Yu ZH, Yuan H, Lu L, Pang SF. A [^{125} I] iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. Neurosci Lett, 1991; 125(2):175-183.

Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Ives JR, Dollins AB, Morabito C, Matheson JK, Schomer DL. Sleep - inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. Clin Phamacol Ther, 1995; 57(5):552-558.