UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Ações imunomoduladoras da prolactina durante a fase aguda da Doença de Chagas experimental.

Marina Del Vecchio Filipin

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Ações imunomoduladoras da prolactina durante a fase aguda da Doença de Chagas experimental.

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Marina Del Vecchio Filipin

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 26.04.2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Filipin, Marina Del Vecchio
Ações imunomoduladoras da prolactina durante a fase aguda da Doença de Chagas experimental. Ribeirão Preto, 2013.
158 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: do Prado Júnior, José Clóvis.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Prolactina. 3. Sistema Imune.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Del Vecchio Filipin
Ações imunomoduladoras da prolactina durante a fase aguda da Doença de Chagas experimental.

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento”.

Provérbios 3:13

SUMÁRIO

Resumo i

Abstract ii

Lista de Figuras iii

Lista de Tabelas iv

Lista de Abreviaturas v

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Doença de Chagas 1

1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune 6

1.2.1 Resposta Imune Inata 8

1.2.2 Óxido Nítrico 11

1.2.3 Ativação da Resposta Imune Adaptativa 14

1.3 Prolactina 18

1.3.1 Receptor de Prolactina (PRLR) 22

1.3.2 PRL Extra-hipofisária 26

1.3.3 Prolactina e suas ações 28

1.3.4 Prolactina e Imunomodulação 30

2. JUSTIFICATIVA 35

3. OBJETIVOS 37

4. MATERIAIS E MÉTODOS 38

4.1 Fluxograma de execução dos experimentos 38

4.2 Animais utilizados 39

4.3 Grupos Experimentais 39

4.4 Protocolo Experimental 40

4.4.1 Infecção Experimental 40

4.4.2 Obtenção de antígenos de tripomastigotas de *T. cruzi* 40

4.4.3 Tratamento com prolactina 41

4.4.4 Delineamento experimental 42

4.4.5 Eutanásia e Coleta de sangue 42

4.5 Contagem de parasitas 42

4.6 Caracterização fenotípica e funcional de células obtidas a partir do lavado peritoneal, através de Citometria de Fluxo 43

4.7 Quantificação de Óxido Nítrico produzido por células obtidas a partir do lavado da cavidade peritoneal 46

4.8 Preparo da suspensão de células provenientes do baço 47

4.9 Análise fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo 47

4.10 Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo - Marcação com anexina-V e iodeto de propídeo 52

4.11 Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α, e quimiocina MCP-1 54

4.12 Análise da proliferação de timócitos através de ensaio com MTT 57

4.13 Análise da proliferação de esplenócitos através de ensaio com CFSE 58

4.14 Análise Estatística 59

5. RESULTADOS 60

5.1 Parasitemia 60

5.2 Análise do percentual de macrófagos peritoneais e expressão de RT1B 61

5.3 Quantificação de Óxido Nítrico produzido por células obtidas a partir do lavado da cavidade peritoneal 64

5.4 Análise do percentual de células apresentadoras de antígenos (CD11 b/c+) e expressão de CD80 e CD86 66

5.5 Análise do percentual de células NK ($CD161^+$) e NKT ($CD3+CD161^+$) 69

5.6 Análise do percentual de Linfócitos B (CD45RA+) 71

5.7 Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ 72

5.8 Análise da expressão de moléculas CD11a e CD28 nas subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ 74

5.9 Linfoproliferação de timócitos 78

5.10 Avaliação da proliferação celular utilizando ensaio de CFSE 80

5.11 Análise do processo de apoptose 82

5.12 Detecção intracelular das citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α 88

5.13 Produção de MCP-1 por células do baço 92

6. DISCUSSÃO 94

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 120

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121

ANEXOS

RESUMO

FILIPIN, M.D.V. **Ações imunomoduladoras da prolactina durante a fase aguda da Doença de Chagas experimental.** 2013. 150f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, o sistema endócrino exerce importante influência no direcionamento da resposta imune do hospedeiro. A prolactina é um dos diversos hormônios envolvidos em uma série de complexas interações com o sistema imunológico, participando diretamente do processo de imunorregulação. As pesquisas relacionadas com a administração de hormônios em modelos experimentais infectados por *T. cruzi* visam comprovar a modulação dos mecanismos de defesa por estas substâncias e contribuem para a busca de novas terapias auxiliares e melhorias no tratamento convencional da Doença de Chagas. O objetivo deste trabalho foi elucidar o papel da prolactina na modulação do sistema imune durante a fase aguda da doença de Chagas experimental, através da administração desta substância em ratos Wistar jovens infectados com a cepa Y de *T.cruzi.* O envolvimento e o perfil de ativação das células de defesa durante a infecção aguda foram analisados, utilizando-se ensaios de linfoproliferação, apoptose de linfócitos e análise de marcadores celulares. Além disso, outros parâmetros imunológicos também foram avaliados, entre eles, citocinas intracelulares IFN-γ, TNF-α, IL-4 e IL-10, quimiocina MCP-1 e óxido nítrico. Os animais submetidos ao tratamento com prolactina apresentaram redução significativa na parasitemia sanguínea, bem como diminuição na apoptose celular e elevados percentuais de células essenciais na resposta imune do hospedeiro frente ao parasita. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho demonstram os efeitos estimulatórios da prolactina e corroboram a ideia da utilização de substâncias imunomoduladoras no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que possam promover o equilíbrio da resposta imune do hospedeiro frente à infecção, prevenindo os possíveis danos teciduais observados tanto na fase aguda como crônica da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Prolactina; Resposta Imune; Doença de Chagas.

ABSTRACT

FILIPIN, M.D.V. **The immunomodulatory effects of prolactin during the acute phase of experimental Chagas' disease.** 2013. 150f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

During the course of infection by *Trypanosoma cruzi,* the host immune system is involved in distinct, complex interactions with the endocrine system, and prolactin (PRL) is one of several hormones involved in immunoregulation. Numerous studies have demonstrated that the modulation of the immune system with the administration of regulatory hormones in different experimental models infected with *T. cruzi*, are very important inciting the investigation of new therapies for Chagas' disease. The role of PRL as a possible factor in the modulation of the immune response was the target of this study using as animal model young rats infected with the Y strain of *T. cruzi*, in the attempt to demonstrate the relationship between the neuroendocrine system and the immune response involved in the acute phase of the experimental Chagas' disease. For this purpose, some immune parameters were analyzed: dosages of cytokines IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10 and chemokine MCP-1, phenotypic analysis of cell subsets by flow cytometry, production of nitric oxide, lymphoproliferation and apoptosis of splenocytes. Therapy with PRL caused a significant decrease in parasitemia during the acute phase. PRL also triggered an increase in the percentage of cells of the innate and adaptive immune response and decreased apoptosis. Thus, the data obtained in this study corroborate the idea of using substances such as PRL in the development of new therapeutic strategies that can modulate the inflammatory response, contributing to the balance of the host body against infection, preventing the possible tissue damage observed in both acute and chronic Chagas' disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Prolactin; Immune response; Chagas' disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica do gene da PRL humana a partir de dois promotores distintos **21**

Figura 2 - Representação ilustrativa do processo de dimerização entre a PRL e o seu receptor (PRLR) **23**

Figura 3 - Representação estrutural do domínio citoplasmático da forma longa do receptor da PRL (PRLR) **25**

Figura 4 - Representação esquemática da via de sinalização JAK-STAT do PRLR **26**

Figura 5 - Estratégia de aquisição de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal, de acordo com as características de tamanho e granulosidade **(A)**. Em **(B)**, o gráfico representativo em *dot plot* da expressão da molécula de RT1B em macrófagos peritoneais.....**44**

Figura 6 - Estratégia de aquisição das células apresentadoras de antígenos, de acordo com as características de tamanho e granulosidade **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo da expressão de CD11b/c. Figuras **(C)** e **(D)** ilustram histogramas representativos das populações de células apresentadoras de antígenos ($CD11b/c^+$), subdivididas em relação à expressão de CD86 e CD80, respectivamente **45**

Figura 7 - Estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e expressão de CD3 **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Figuras **(C)** e **(D):** gráficos em *dot plot* das subpopulações de linfócitos, subdivididas em relação à expressão de CD11a e CD28, respectivamente **50**

Figura 8 - Seleção da população celular de acordo com as características de tamanho e granulosidade **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo das populações de células esplênicas, expressando $CD161^+$ (NK) e $CD3^+CD161^+$ (NKT). Em **(C)**, gráfico em *dot plot* representativo da expressão da molécula CD45RA **51**

Figura 9 - Estratégia da seleção da população células esplênicas, para caracterização dos estágios de apoptose **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo dos estágios de apoptose, utilizando-se Anexin-V (FITC) e PI **53**

Figura 10 - Em **(A),** estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com as características de tamanho, granulosidade e expressão de CD3; gráfico em *dot plot* representativo das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Em **(B)**, histogramas representativos das subpopulações de linfócitos, subdivididas em relação à expressão de IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e MCP-1 .....**56**

Figura 11 - Evolução da parasitemia em ratos Wistar infectados com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, durante os 7º e 14° dias após a infecção **60**

Figura 12 - Representação gráfica dos níveis de expressão do antígeno de superfície celular ED2- like (marcador de macrófagos teciduais) em células obtidas a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos **62**

Figura 13 - Representação gráfica dos níveis de expressão do antígeno RT1B (MHC classe II, I-A equivalente) em macrófagos obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos **63**

Figura 14 - Concentrações de Nitrito (μM) em culturas de células peritoneais estimuladas ou não com LPS, coletadas de ratos Wistar durante 7º e 14° dias de experimentos **65**

Figura 15 - Representação gráfica dos níveis de expressão do marcador CD11b/c em células do baço **(A)** e do lavado peritoneal **(B)** de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos.....**67**

Figura 16 - Representação gráfica dos níveis de expressão das moléculas CD80 e CD86 em células CD11b/c+ do baço **(A, B)** e do lavado peritoneal **(C, D)** de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos **68**

Figura 17 - Análise do percentual de células NK **(A)** e NKT **(B)**, obtidas a partir do baço de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos **70**

Figura 18 - Representação gráfica dos níveis de expressão da molécula CD45RA (marcador de linfócito B) em células obtidas a partir do baço de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos **71**

Figura 19 - Análise das subpopulações de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ **(A)** e T $CD3^+CD8^+$ **(B)** no baço de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos **73**

Figura 20 - Avaliação do percentual de linfócitos $TCD4^+CD11a^+$ **(A)** e $TCD8^+CD11a^+$ **(B)** em células esplênicas de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos **75**

Figura 21 - Avaliação do percentual de linfócitos $TCD4^+CD28^+$ **(A)** e $TCD8^+CD28^+$ **(B)** em células esplênicas de ratos Wistar **77**

Figura 22 - Proliferação de timócitos coletados de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos **79**

Figura 23 - Proliferação de esplenócitos coletados de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos (ensaio de CFSE) **81**

Figura 24 - Marcação de células esplênicas de ratos Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, durante 7º e 14° dias de experimentos. As células foram marcadas com anexina-V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose **(A)** e também com anexina-V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose **(B)**. Em **(C)**, células viáveis **83**

Figura 25 - Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, durante os 7º e 14° dias de experimentos. As células foram marcadas com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose **(A e B)** e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose **(C e D)** **85**

Figura 26 - Marcação de células esplênicas, não estimuladas **(A)** ou estimuladas **(B)** com extrato parasitário (25µg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, durante os 7º e 14° dias de experimentos. Gráficos A e B: análise do percentual de células viáveis (anexina V $FITC^{-}PI^{-}$) **87**

Figura 27 - Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T CD4+ esplênicos de ratos Wistar durante os 7º e 14° dias de experimentos **89**

Figura 28 - Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T CD8+ esplênicos de ratos Wistar durante os 7º e 14° dias de experimentos **91**

Figura 29 - Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD4+ esplênicos de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos **92**

Figura 30 - Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD8+ esplênicos de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos **93**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação qualitativa dos resultados obtidos no estudo **119**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Oneway analysis of variance
APC	Aloficocianina (*Allophycocyanin)*
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BSA	Albumina sérica bovina *(Bovine serum albumin)*
CD	Designação de grupos *(Cluster of differentiation)*
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*)
ConA	Concanavalina A
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Isotiocianato de fluoresceína *(Fluorescein isothiocyanate)*
GH	Hormônio do crescimento *(Growth hormone)*
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOs	Óxido Nítrico Sintase Induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína Quimiotática para monócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Célula Natural killer
NKT	Célula Natural killer T
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino *(Phosphate-buffered saline)*
PE	Ficoeritrina *(r-phycoerythrin)*
PECy7	*phycoerythrin conjugated with cyanine dye 7*
PerCP	Proteína clorofil-peridina (*Peridinin Chlorophyll Protein)*
PI	Iodeto de propídeo
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor da prolactina
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	Meio de Cultura *Roswell Park Memorial Institute*
SBF	Soro Bovino Fetal
TNF-α	Fator de Necrose tumoral alfa

1. Introdução

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma parasitose decorrente da infecção causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum*). Esta doença foi inicialmente descrita, em 1909, pelo médico pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que além de identificar o parasita, determinou todos os aspectos da doença, tais como anatomia patológica, epidemiologia, etiologia, formas clínicas, meios de transmissão, patogenia, profilaxia, sintomatologia e ciclo evolutivo (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma enfermidade humana relacionada com o subdesenvolvimento e baixas condições socioeconômicas, e representa um sério problema de saúde pública na América Latina, com mais de 25 milhões de pessoas expostas ao risco da infecção no continente (MATHERS et al., 2007; MONCAYO, SILVEIRA, 2009; WHO, 2010). A doença estende-se desde o Texas nos Estados Unidos até aos países do cone sul, e de acordo com os dados estimados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas por *T. cruzi* no mundo, principalmente nos países latino-americanos, onde a doença é endêmica (WHO, 2010). Vale ressaltar que um número cada vez maior de doentes é detectado nos Estados Unidos, Canadá e em países da Europa e do Pacífico Ocidental, como consequência direta da emigração dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas (SCHMUNIS, 2007; GASCON et al., 2010; PARKER, SETHI, 2011).

Inicialmente, o *Triatoma infestans*, um artrópode da classe dos insetos hemípteros, conhecido popularmente como “barbeiro”, era o principal vetor da doença de Chagas (RASSI et al., 2010). No entanto, atualmente, outros triatomíneos hematófagos pertencentes à Família Reduviidae também são considerados importantes transmissores da doença, tais como *Rhodnius prolixus, Panstrongylus megistus, Triatoma pseudomacula, Triatoma dimidata* e outras espécies domésticas (ZELEDON, RABINOVICH, 1981).

Em seu ciclo evolutivo, *T. cruzi* apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, e entre as suas formas morfogenéticas estão: as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica infectante, presentes no tubo digestivo do inseto vetor, e as formas amastigotas e tripomastigotas sanguícolas presentes no hospedeiro vertebrado (BRENER, 1971; RASSI et al., 2009).

Antes da presença humana nos ecótopos naturais, *T. cruzi* se encontrava restrito à situação silvestre, circulando, por meio do inseto vetor, entre hospedeiros mamíferos, como marsupiais, roedores e tatus. O homem passou a fazer parte deste ciclo epidemiológico quando invadiu esses ecótopos, oferecendo novas opções de disseminação ao vetor (COURA, DIAS, 2009; VINHAES, DIAS, 2000). Dessa forma, os “barbeiros” passaram a coabitar as instalações humanas colonizando os mais variados locais como buracos ou fendas em paredes, onde encontraram condições ideais de abrigo e oferta alimentar abundante, o que favoreceu a difusão da doença (DIAS, BORGES DIAS, 1979; WHO, 2002).

Diante disso, o principal meio de contágio da doença de Chagas ainda é a transmissão vetorial, que ocorre no momento do repasto sanguíneo dos triatomíneos contaminados com *T. cruzi*. Após realizar a hematofagia em um hospedeiro vertebrado, o inseto vetor libera nas suas fezes ou urina, as formas

tripomastigotas metacíclicas do protozoário, que penetram na pele ou mucosas através da solução de continuidade (GARCIA et al., 2010). Estas formas invadem diversos tipos de células, principalmente fagócitos mononucleares e fibroblastos, e já no citoplasma celular, o parasita transforma-se na forma amastigota que se reproduz por divisão binária (de SOUZA et al., 2010). Posteriormente, as células parasitadas se rompem, liberando as formas tripomastigotas que alcançam a circulação e disseminam a infecção em ciclos (GARCIA et al., 2010).

Além da transmissão vetorial, mecanismos secundários também foram estabelecidos, tais como a transmissão congênita (TORRICO et al., 2004), via transfusional (SCHMUNIS, 1999; BERN et al., 2008), amamentação (DIAS, AMATO NETO, 2011), acidentes de laboratório e manejo de animais infectados, bem como transplante de órgãos e transmissão sexual (CHIEFFI, AMATO NETO, 2000; CARLIER et al., 2002; CDC, 2006; DIAS, AMATO NETO, 2011). Recentes surtos no sul do Brasil e no estado do Pará demonstram a importância da transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com o parasita (PEREIRA et al., 2009; YOSHIDA, 2009).

Com base nas características do quadro clínico do hospedeiro infectado, a doença de Chagas pode apresentar as fases aguda e crônica (RASSI et al., 2010). A fase aguda se estabelece logo após a infecção e geralmente, se caracteriza por apresentar elevados níveis de parasitemia e parasitismo tissular (GOMES e et al., 2009). Clinicamente, o hospedeiro pode desenvolver manifestações locais, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, que ocorrem devido à reação inflamatória existente na porta de entrada do parasita, no caso da transmissão vetorial (WHO, 2002; PARKER, SETHI, 2011). Esses sinais podem ser seguidos de febre, mal-estar geral, hepatoesplenomegalia e

adenomegalia (MONCAYO, YANINE, 2006; RASSI et al., 2010), sendo que, mais raramente, alguns casos podem apresentar complicações neurológicas, cardíacas e pulmonares, muitas vezes fatais, principalmente em crianças (TORRICO et al., 2004).

Em hospedeiros imunocompetentes, a resposta imune dirigida contra o parasita progride e a infecção é controlada, determinando o desaparecimento das formas tripomastigotas do sangue (RASSI, et al., 2010). A doença evolui, então, para a sua forma indeterminada, onde esses indivíduos infectados permanecem assintomáticos por um longo período, sem apresentar nenhum tipo de manifestação clínica (RASSI, et al., 2010).

A ausência de sintomas pode persistir por toda a vida do indivíduo, entretanto, dependendo do tipo de cepa e estado imunológico do hospedeiro, cerca de 30% dos pacientes infectados podem desenvolver a síndrome característica da fase crônica, evidenciada pelo aparecimento das manifestações cardíacas e/ou digestivas (DIAS, 1995). As alterações na função cardíaca são as mais sérias devido à morbimortalidade e estão relacionadas com anormalidades no sistema de condução do coração, tromboembolismo, arritmias, hipertensão arterial, miocardioesclerose e morte súbita (RASSI, et al., 2000; MARIN-NETO et al., 2010). Já as complicações digestivas manifestam-se pela dilatação do cólon e do esôfago, em consequência da desnervação de células ganglionares do plexo mesentérico (KÖBERLE, 1968; MATSUDA et al., 2009).

O diagnóstico da doença na fase crônica geralmente é realizado pela detecção de anticorpos IgG específicos contra *T. cruzi* através de exames sorológicos, como imunofluorescência, ELISA e hemaglutinação indireta (BRASIL, 2005; GOMES, et al., 2009). Recentemente, a análise do DNA do parasita através

de técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), também tem sido considerada uma metodologia viável, especialmente em casos de sorologia inconclusiva e monitoramento da eficácia do tratamento (BRASIL, 2005; BRITTO, 2009).

É importante ressaltar que *T. cruzi* apresenta uma patogenia especialmente determinada por aspectos próprios do hospedeiro e da população infectante e, portanto, o curso da infecção nos vertebrados susceptíveis é influenciado por fatores como idade, sexo e constituição genética do hospedeiro, além de características genéticas e morfológicas da cepa infectante, entre outros fatores (BRENER et al., 2000; MANOEL-CAETANO, SILVA, 2007; GARCIA et al., 2010).

Além disso, em função das suas características biológicas e genéticas, *T. cruzi*, constitui-se de diferentes cepas que podem ter comportamentos distintos quando inoculadas experimentalmente em hospedeiros vertebrados (MELO, BRENER, 1978; MACEDO, PENA; 1998; ANDRADE et al., 2010). Andrade et al. (1976) relataram a existência de cepas com predominância de formas delgadas e tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com maior frequência esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea, apresentando altos e precoces picos parasitêmicos. Entretanto, existem cepas que apresentam característica morfológica larga, marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (MARTINI et al., 1986). Esse tipo de conformação morfológica confere a estas cepas uma maior resistência aos anticorpos circulantes, e como consequência, as formas tripomastigotas permanecem por mais tempo na corrente circulatória, determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente por meio do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, incluindo roedores silvestres (SANTOS et al., 2008; CAETANO et al., 2008; TANIWAKI et al., 2011), camundongos (CARDILLO et al., 1996) e ratos (BRAZÃO et al., 2008; SANTELLO et al., 2009), podendo reproduzir nos mesmos os distintos aspectos imunológicos e patológicos da doença humana (ANDRADE, MAGALHÃES 1996; ANDERSSON et al., 2003).

1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune

A ação do sistema imune do hospedeiro frente à infecção por *T. cruzi* é um dos principais fatores que determinam a ocorrência de diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas no homem. Além de reduzir a multiplicação do parasita durante a fase aguda, a ativação da resposta imunológica também pode determinar a patogenia nos tecidos na fase crônica (BRENER, GAZZINELLI, 1997; ANDRADE, 1999).

A resistência do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi* e a limitação à multiplicação do parasita durante a fase aguda da doença dependem do estabelecimento de uma resposta imune específica, que requer a combinação de mecanismos efetores desenvolvidos tanto pela imunidade inata, quanto pela adquirida (ALIBERTI et al., 1996). Estes processos envolvem diferentes compartimentos do sistema imune e diversos tipos de células que incluem macrófagos, células natural killer (NK), células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e linfócitos B, produtores de anticorpos (BRENER, GAZZINELLI, 1997; SACKS, SHER, 2002; MARTIN, TARLETON, 2004). A mobilização do sistema imune na fase aguda é

essencial na redução dos níveis de parasitas sanguíneos e teciduais (ALIBERTI et al., 1996; SACKS, SHER, 2002), porém não é capaz de eliminar, em definitivo, o parasita do organismo do hospedeiro, contribuindo para o aparecimento das manifestações crônicas (BRENER et al., 2000; BUSTAMANTE et al., 2007).

Sabe-se que a resposta inflamatória e as lesões celulares, ao lado das alterações da matriz extracelular e dos fenômenos degenerativos, constituem os processos patológicos fundamentais da doença de Chagas (GATTASS et al., 1988; PALOMINO et al., 2000; CUNHA-NETO et al., 2006; GUTIERREZ et al. 2008; MACHADO et al., 2012a,b). Ademais, os processos autoimunes também têm sido apresentados por diversos autores como possíveis mecanismos patogênicos da doença nos órgãos comprometidos, principalmente no coração (SANTOS-BUCH, TEIXEIRA, 1974; KALIL, CUNHA-NETO, 1996; SOARES et al., 2001; ENGMAN, LEON, 2002; KIERSZENBAUM, 2005; HYLAND, ENGMAN, 2006; CUNHA-NETO et al., 2011)

A predominância de células mononucleares no infiltrado inflamatório, juntamente com a deposição de complemento e de autoanticorpos específicos para antígenos intrínsecos do tecido cardíaco, como as proteínas estruturais de miosina, seriam as principais evidências do envolvimento de fatores imunológicos na patogênese da doença (KIERSZENBAUM, 1999; NUÑEZ-APAZA, 2008). Diversos mecanismos são descritos como possíveis precursores da autoimunidade durante a infecção por *T. cruzi*, como por exemplo, a ativação policlonal, o mimetismo molecular e a reação cruzada com epítopos partilhados entre o parasita e proteínas cardíacas (CUNHA-NETO et al., 1995; CUNHA-NETO, 1996; LEON, ENGMAN, 2003; MARIN-NETO et al., 2007) . Por outro lado, a aplicação experimental de técnicas mais sensíveis na detecção do parasita no tecido do hospedeiro, como

imunohistoquímica, PCR e métodos de hibridização *in situ*, tem renovado o conceito de que a agressão e o dano tecidual dependem da persistência do parasita (JONES et al., 1993; HIGUCHI et al., 1993; VAGO et al., 1996, 2003; REIS et al., 1997).

A evolução da doença de Chagas e o aparecimento das manifestações clínicas na fase crônica irão depender, principalmente, do equilíbrio entre os mecanismos da resposta imune frente ao parasita e o processo inflamatório exacerbado prejudicial aos tecidos do hospedeiro (RASSI et al., 2010).

1.2.1 Resposta Imune Inata

Os mecanismos de invasão celular de *T. cruzi* são processos essenciais para o sucesso da infecção, pois garantem a multiplicação e, consequentemente, a sobrevivência do parasita no hospedeiro (DosREIS, 2011; DUTRA, GOLLOB, 2008). Sabe-se que a adesão seguida pela internalização de *Trypanosoma cruzi* são etapas que dependem da interação entre as moléculas de superfície do protozoário com a célula-alvo (ANDRADE, ANDREWS, 2005). Diversas moléculas das formas tripomastigotas infectantes, que estão envolvidas nos processos de penetração e ocupação celular, também são capazes de estimular a resposta imune inata do hospedeiro no primeiro contato com o parasita, como por exemplo, a enzima trans-sialidase, as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) e as GPI-mucinas (GAZZINELLI, DENKERS, 2006; MARTIN et al., 2006).

O sistema imune inato, assim como o sistema imune adaptativo, também possui a habilidade de reconhecer os antígenos de microrganismos invasores e desta forma, ativar os mecanismos de defesa do hospedeiro (KAYAMA, TAKEDA, 2010). Este processo é baseado principalmente na detecção de estruturas

específicas, encontradas somente nos patógenos microbianos e, portanto, ausentes nas células dos mamíferos (JANEWAY, 2001).

Os receptores do sistema imune inato, como por exemplo, os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* ou TLRs), detectam a presença do parasita através do reconhecimento de padrões moleculares conservados nos tripanossomos (TARLETON, 2007; PELLEGRINI et al., 2011). Os TLRs são uma família de proteínas transmembrânicas expressas em diferentes tipos de células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais mucosas e células endoteliais (TAKEDA et al., 2003; AKIRA et al., 2006; TRINCHIERI, SHER, 2007). Dentre os membros da família de TLR, o TLR-2 é um dos principais receptores envolvidos na indução da resposta imune inata, durante a infecção causada por *T. cruzi* (CAMPOS et al., 2001). De acordo com Campos e colaboradores (2001), as âncoras de GPI distribuídas pela superfície da membrana celular de formas tripomastigotas, são reconhecidas por TLR-2 e induzem a produção de IL-12, NO e TNF-α por macrófagos.

A via de sinalização predominante usada pelos TLRs resulta na ativação do fator de transcrição NF-κB. Nesta via, a ligação do padrão molecular do parasita ao TLR, localizado na superfície da célula do hospedeiro, leva ao recrutamento de várias moléculas de sinalização citoplasmática mediante interações específicas domínio-domínio. Os genes que são expressos em resposta à sinalização pelo TLR codificam proteínas importantes em muitos componentes diferentes da resposta imune inata, incluindo citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-12, moléculas de adesão e coestimulatórias, além de proteínas envolvidas nos mecanismos de morte e diferenciação celular (AKIRA et al., 2001; TAKEDA et al., 2003; ABBAS, 2005).

O TNF-α é uma citocina produzida pelos macrófagos após a interação molecular do *T. cruzi* com essas células, sendo muito importante no controle do parasitismo no início da infecção (ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1996). Sua principal função é estimular o recrutamento das células de defesa para o local da infecção e ativá-las para eliminar o microrganismo invasor. Para isto, o TNF-α atua sobre as células endoteliais das vênulas localizadas próximas ao sítio da infecção, aumentando a expressão de moléculas de adesão, como as selectinas e os ligantes para integrinas de leucócitos (LAUCELLA et al., 1996). Em contrapartida, a produção de TNF-α em quantidades elevadas pode causar uma resposta inflamatória exacerbada e, consequentemente, resultar em danos teciduais e agravar os processos patológicos da doença (ROGGERO et al., 2002; LANNES-VIEIRA et al., 2011). De acordo com diversos autores, o TNF-α está envolvido na severa atrofia tímica presente na infecção chagásica e, juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e a IL-6, ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estimulando a produção de glicocorticoides (BESEDOVSKY, DEL REY, 2000).

A IL-12 também é uma citocina produzida pelas células apresentadoras de antígenos e atua, principalmente sobre as células NK, acentuando sua função citolítica e elevando a produção de IFN-γ por essas células (MICHAILOWSKY et al., 2001). Além disso, a IL-12 também promove a interação entre a imunidade inata e a adquirida, sendo essencial na diferenciação das células T $CD4^+$ naive em células efetoras Th1, produtoras de IFN-γ (ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1995; MÜLLER et al., 2001; ABBAS, 2005). Vários estudos demonstraram a importância da IL-12 no controle da infecção chagásica. Camundongos deficientes em IL-12 apresentaram elevados níveis de parasitismo sanguíneo e tecidual, além de alta taxa de mortalidade (UNE et al., 2003). Já a administração de IL-12 recombinante aos

camundongos infectados foi capaz de tornar esses animais mais resistentes a *T. cruzi* e reduzir os níveis de parasitemia (HUNTER et al., 1996; GALVÃO DA SILVA, ABRAHAMSOHN, 2001).

O IFN-γ produzido pelas células NK e pelos linfócitos T ativados age sobre os macrófagos, aumentando notavelmente sua ação tripanomicida e tornando-os células efetoras na contenção da replicação intracelular do parasita, através do aumento na produção de IL-12 e da indução da biossíntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (HÖLSCHER et al., 1998; SILVA et al., 2003; GUTIERREZ et al., 2009).

1.2.2 Óxido Nítrico

A molécula de NO está envolvida em diversas funções biológicas de diferentes sistemas fisiológicos, tais como relaxamento da musculatura lisa vascular, agregação de plaquetas e neurotransmissão (MONCADA et al., 1991; MONCADA, HIGGS, 2006). A biossíntese de NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina e é catalisada pela enzina NO sintase, com a participação da forma reduzida do NADPH (GRIFFITH, STUEHR, 1995).

A relação do NO com o sistema imunológico e a sua capacidade de destruir células tumorais e parasitas intracelulares foram descritas inicialmente na década de 80, quando alguns autores demostraram que a citotoxidade dos macrófagos dependia essencialmente da presença de L-arginina e que a atividade destas células era acompanhada pela formação de nitrito e citrulina, produtos finais da conversão da L-arginina (NATHAN, HIBBS, 1991). A reação da molécula de NO com o radical superóxido (O_2^-) resulta na formação do peroxinitrito (^-OONO), um

potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases de DNA, além de causar a nitrosilação de proteínas, sendo bastante tóxico para parasitas intracelulares, como *T. cruzi* (RADI et al., 1991a,b; DENICOLA et al., 1993).

A enzima NO sintase (NOS), responsável pela produção do óxido nítrico, possui três diferentes isoformas, que diferem na sua localização celular e expressão, sendo elas: constitutiva, induzida e neuronal (QUEIROZ, BATISTA, 1999). A NOS_2, também conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS), é produzida por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, e fibroblastos (VESPA et al., 1994). O aumento na expressão de iNOS se faz em resposta a diferentes estímulos, tais como IL-1, IFN-γ, TNF-α e lipopolissacarídeos (LPS) (MONCADA et al., 1991; DING et al., 1995); já determinadas citocinas como a IL-4 e a IL-10 e também TGF-β e glicocorticoides podem inibir a atividade desta enzima (MAYER, HEMMENS, 1997; ALONSO-TRUJILLO et al., 2007; WALSH et al., 2007). Durante a infecção chagásica, os níveis de iNOS estão aumentados e de acordo com estudos de Rottenberg et al. (1996), além de estar presente nos macrófagos ativados, esta isoforma também é encontrada nos infiltrados celulares e tecidos infectados, próximos aos ninhos de parasitas.

No caso da infecção por *T. cruzi*, o NO produzido pelos macrófagos ativados possui importante atividade antiparasitária, sendo capaz de causar danos ao DNA cinetoplástico e nuclear do parasita (FLORA, ZILBERSTEIN, 2000; AKAMINE et al., 2007; MARCACCINI et al., 2007; GUITIERREZ et al., 2009; CABRERA et al., 2011).

Devido a sua capacidade de ativar a expressão da enzima iNOS, o IFN-γ é considerado um dos principais indutores da atividade microbicida dos

macrófagos, em várias infecções causadas por parasitas intracelulares (TORRICO et al., 1991; BRUNET, 2001). De acordo com o trabalho de Hölscher e colaboradores, os camundongos deficientes em receptor de IFN-γ (IFN-γR-/-) ou deficientes na enzima iNOs apresentaram alta susceptibilidade à infecção causada por *T. cruzi*, com elevados níveis de parasitemia e taxa de mortalidade (HÖLSCHER et al., 1998).

No entanto, o NO também pode estar envolvido no comprometimento tecidual presente na doença de Chagas (GARCIA et al., 1999). A ativação da enzima iNOs e a produção exacerbada de NO e de potentes oxidantes, como o peroxinitrito, estão diretamente associadas ao surgimento de desordens neurodegenerativas (BO et al., 1994; SMITH et al., 1997; LEE et al., 1999). A diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico, acompanhada de um processo inflamatório local, são as principais características evidenciadas nas manifestações digestivas da doença de Chagas, como o megaesôfago e o megacólon (KÖBERLE, 1968; TAFURI, 1971). Apesar destas manifestações clínicas surgirem geralmente na fase crônica da doença, diversos estudos afirmam que a destruição da célula nervosa ocorre durante a fase aguda da infecção e, principalmente em locais próximos à pseudocistos rompidos (KÖBERLE, 1970).

Estudos de Garcia e colaboradores (1999) avaliaram a relação do NO com a perda neuronal e desnervação muscular periférica presentes na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Através da utilização de ratos tratados com N-nitro-L-arginina, um inibidor da iNOs, os autores demonstraram que a perda de neurônios do coração e do cólon foi menor nestes animais, onde a produção de NO estava comprometida. Mas, em contrapartida, o parasitismo cardíaco apresentou-se mais intenso nos animais tratados com o inibidor.

Portanto, para que o hospedeiro seja beneficiado e o equilíbrio do sistema imune mantido durante a infecção, os efeitos citotóxicos do NO devem estar em equilíbrio com suas ações antiparasitárias.

1.2.3 Ativação da Resposta Imune Adaptativa

A ativação de mecanismos da resposta imune adaptativa durante a infecção causada por *T. cruzi*, é desencadeada pelo reconhecimento dos antígenos do parasita pelas células efetoras do hospedeiro, como os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (Dos REIS, 1997; KAYAMA, TAKEDA, 2010). As células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *Antigen Presenting Cells*) são responsáveis pela captura e exibição do parasita para os linfócitos. Elas convertem antígenos proteicos do microrganismo invasor em fragmentos peptídeos, que são associados a moléculas da superfície celular codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e exibidos aos linfócitos T (ABBAS, 2005).

De uma maneira geral, os receptores dos linfócitos T auxiliares $CD4^+$ reconhecem de forma restrita, os peptídeos ligados a moléculas do MHC classe II. Neste caso, os peptídeos são derivados de antígenos proteicos capturados e interiorizados em endossomos e vesículas das APCs. Já os receptores dos linfócitos T citotóxicos CD8+ reconhecem os peptídeos ligados a moléculas de MHC classe I e derivados de proteínas citosólicas (ABBAS, 2005).

As células dendríticas são as APCs mais eficazes em iniciar as respostas antígeno-específicas dos linfócitos T (GUERMONPREZ et al., 2002). Elas estão localizadas no epitélio da maioria dos órgãos, onde sua principal função é capturar os antígenos invasores no local da infecção e transportá-los para os órgãos

linfoides periféricos (BANCHEREAU et al., 2000). Durante sua migração para os linfonodos e demais tecidos linfoides, as células dendríticas amadurecem, perdem a adesividade para epitélios e sofrem significativa alteração no seu fenótipo, com um aumento na expressão de MHC classe II, de moléculas coestimuladoras e do receptor de quimiocina CCR7, que é específico para quimiocinas produzidas nas zonas de linfócitos T dos linfonodos (CAUX et al., 1994; BANCHEREAU et al., 2000; MORA 2008; VILLABRANCA et al, 2008). Em relação à doença de Chagas, Chaussabel et al. (2003) demonstraram que durante a infecção aguda por *T. cruzi*, as células dendríticas permanecem imaturas e com baixa expressão de B7.2, uma molécula coestimuladora, sugerindo que a infecção pode causar profundas alterações no processo de migração e maturação dessas células.

Os macrófagos são APCs capazes de fagocitar grandes partículas e desempenham importante papel na apresentação de antígenos provenientes de organismos infecciosos fagocitados, como os parasitas intracelulares (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002; ZHANG et al., 2010). Já na fase efetora da imunidade celular, os linfócitos T ativados já diferenciados em Th1 ou Th2, migram dos tecidos linfóides para os tecidos periféricos, onde reconhecem os antígenos invasores apresentados pelos macrófagos, e iniciam o desenvolvimento de suas funções a fim de destruir esses microrganismos (ABBAS, 2005; GRAY, CYSTER, 2012).

A apresentação do peptídeo antigênico, associado à molécula de MHC e o seu reconhecimento pelo receptor da célula T (TCR) são os primeiros passos necessários para a ativação da resposta imune celular (SCHWARTZ, 1990, 2003; ABBAS, 2005). No entanto, além desta etapa, a eficácia da resposta celular depende também de um segundo sinal, conhecido como coestimulação, que está relacionado com a interação de determinadas moléculas presentes na superfície da

célula apresentadora de antígeno com correceptores dos linfócitos T (SCHWARTZ, 2003; COLLINS et al., 2005). Na ausência da coestimulação, os linfócitos não são capazes de responder aos antígenos e entram em um estado de anergia, sendo eliminados por apoptose (APPLEMAN, BOUSSIOTIS, 2003; SANSOM, WALKER, 2006).

Os mecanismos de coestimulação mais bem definidos até o momento envolvem principalmente, as moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que estão localizadas nas APCs, e tem como receptor, a molécula CD28, expressa na superfície das células T (THOMPSON, 1995; FROSCH et al., 1997; SHARPE, FREEMAN, 2002). A ligação entre as moléculas da família B7 e o CD28 promove a proliferação e a ativação celular, através do aumento na produção de IL-2 pelos linfócitos T e diferenciação de células T naive em células efetoras e de memória (VAN GOOL et al., 1996; PLETINCKX et al., 2011). Durante a fase aguda da infecção causada por *T. cruzi*, o CD28 está diretamente envolvido na modulação da resposta imune e controle da parasitemia, atuando como importante mediador na ativação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ e na produção de IFN-γ e NO (MIYAHIRA et al., 2003; MARTINS et al., 2004).

Após o processo de reconhecimento do antígeno, as células T $CD4^+$ tornam-se ativadas, e geralmente se diferenciam em subpopulações Th1 ou Th2, de acordo com o padrão de citocinas produzidas (ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1995; KUMAR, TARLETON, 2001; VIVEROS-PAREDES et al., 2006). Além da capacidade de potencializar os mecanismos efetores dos macrófagos, os linfócitos T $CD4^+$ induzem a produção de anticorpos citofílicos e ativadores de complemento pelas células B e auxiliam na ativação das células T $CD8^+$ (TARLETON, 1995; JANSSEN et al., 2003). O IFN-γ e a IL-12 são os principais indutores da resposta Th1,

enquanto a IL-4 promove a diferenciação de linfócitos Th2 (AKIRA et al., 2001; HOFT, EICKHOFF, 2002).

Durante a infecção por *T. cruzi*, a proporção das subpopulações Th1/Th2 é um fator determinante das funções protetoras e das consequências patológicas da resposta imune induzida no hospedeiro. A polarização para um perfil funcional Th1 é fundamental para o controle da parasitemia na fase aguda da doença e para a resistência ao parasita (NICKELL et al., 1993; ALIBERTI et al., 1996; RODRIGUES et al., 2012).

Em infecções por microrganismos intracelulares, como *T. cruzi*, as células T $CD8^+$ desempenham função protetora, especialmente no estágio inicial da infecção, pois uma vez diferenciadas em linfócitos T citolíticos, são capazes de destruir outras células que contenham formas amastigotas do parasita, através da liberação de grânulos contendo proteínas citotóxicas (NICKELL, SHARMA, 2000). Diversos estudos demonstraram que modelos animais deficientes de células $CD8^+$ são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* e apresentam taxas elevadas de mortalidade e parasitemia (MARTIN, TARLETON, 2004). Entretanto, a predominância desta subpopulação nos diferentes compartimentos teciduais, principalmente tecido cardíaco, de pacientes com patologia crônica, indicam que os linfócitos T $CD8^+$ podem contribuir para o descontrole da infecção, gerando uma resposta inflamatória persistente e danosa, durante a fase crônica da doença (HIGUCHI et al., 1993; MARTIN, TARLETON et al., 2004; dos SANTOS et al., 2001; SILVERIO et al., 2012).

1.3 Prolactina

A Prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico envolvido em um amplo espectro de processos biológicos, sendo sintetizado e secretado primariamente por células especializadas da hipófise anterior, denominadas lactotrofos (FITZGERALD, DINAN, 2008). Em hipófises normais, os lactotrofos constituem cerca de 15% a 25% das células funcionais e apesar do número absoluto não se modificar com a idade, há hiperplasia dessas células durante a gravidez e a lactação. O fator de transcrição POU1F1 (Pit-1) tem participação importante na diferenciação e proliferação dos lactotrofos, e a sua inativação pode resultar na diminuição no número dessas células e consequentemente na deficiência da produção de prolactina (RHODES et al., 1994).

Em 1928, os pesquisadores franceses, Stricker e Grueter foram os primeiros a estabelecer e identificar a influência da hipófise sobre a secreção do leite em coelhos (STRICKER, GRUETER, 1928). Cinco anos mais tarde, cientistas americanos desenvolveram um método de extração e purificação do respectivo hormônio hipofisário e o denominaram como Prolactina (PRL) (RIDDLE et al., 1933).

A purificação e o isolamento da PRL no ser humano e sua distinção do hormônio do crescimento (GH) foram elucidados somente após 1970, através de estudos de HWANG et al., 1971, LEWIS et al., 1971 e HWANG et al., 1972, responsáveis pelo desenvolvimento de um método radioimunoensaio específico para PRL humana.

A forma livre da PRL monomérica representa cerca de 80% da PRL total no soro de indivíduos normais e é constituída por uma cadeia única de 199

aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 23 kDa e três pontes dissulfeto (FREEMAN et al., 2000). O modelo estrutural da PRL, obtido através de estudos de difração de raios-x e ressonância magnética nuclear, demonstraram que a PRL é composta por um ramo de quatro α-hélices, dispostos em dois pares antiparalelos, sendo que o restante da molécula se organiza em estruturas desorganizadas tipo alça ("*loop*"). Trabalhos mais recentes, referentes à definição da estrutura tridimensional da PRL, revelaram maiores detalhes sobre as suas características e concluíram que a conformação clássica da PRL apresenta semelhanças claras com a conformação de outras proteínas da família das citocinas hematopoiéticas (KEELER et al., 2003; TEILUM et al., 2005).

Em humanos, além da forma monomérica citada acima, há outras formas variantes de PRL circulante que podem ser decorrentes de processos determinados geneticamente ou formadas após modificações pós traducionais. A grande maioria das isoformas é resultante de modificações pós traducionais, como glicosilação, acetilação, deaminação, proteólise, fosforilação e agregação molecular, e diferem entre si no tamanho e nos grupos funcionais agregados (FRASER, ZHUANG, 1990). Sendo assim, de acordo com o peso molecular, as isoformas de PRL identificadas são: a monomérica (mPRL), já relatada anteriormente; a dimérica ou "big prolactina" (bPRL), de 45 kDa a 60 kDa; a macroprolactina ou "big-big-PRL" (bbPRL), com mais de 100 kDa, que consiste em um complexo antígeno-anticorpo de mPRL e IgG; a PRL glicosilada, resultante da glicosilação da mPRL e com menor imunorreatividade e atividade biológica; e a 16 kDa-PRL, produto da clivagem proteolítica da mPRL, com importante ação anti-angiogênica (LEE et al., 2011). Há ainda a isoforma de 22 kDa que pode possuir papel importante na reprodução

feminina e é resultante da clivagem pela calicreína, uma tripsina-like serina protease (POWERS, HATALA, 1990).

O gene que codifica a PRL está presente em cópia única, nos cromossomos 6 e 17 em humanos e ratos, respectivamente, e apresenta cinco éxons (OWERBACH et al., 1981; TRUONG et al., 1984). Funcionalmente, duas regiões promotoras do gene são reconhecidas, nos humanos: a proximal responsável pela transcrição do RNAm da PRL hipofisária, e a distal, responsável pela transcrição da PRL extra-hipofisária (BERWAER et al., 1994). No entanto, a proteína traduzida é exatamente a mesma (FREEMAN et al., 2000; BOLE-FEYSOT et al., 1998) (Figura 1).

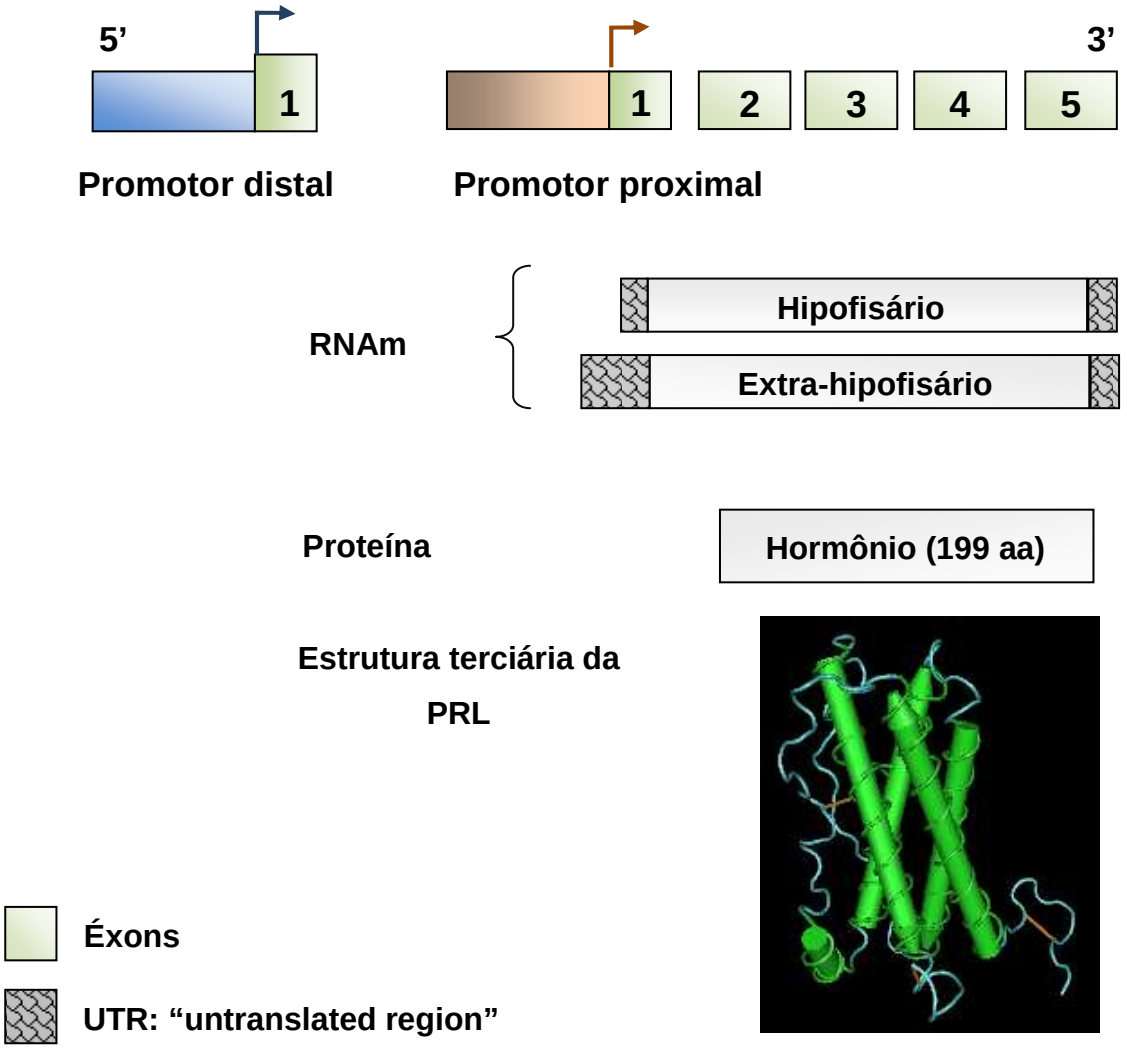


Figura 1 - Representação gráfica do gene da PRL humana a partir de dois promotores distintos (GLEZER, 2005; TEILUM et al., 2005).

A secreção da maioria dos hormônios hipofisários é aumentada por fatores neurossecretores de liberação transmitidos do hipotálamo até a glândula hipófise anterior através do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, porém, no caso da PRL hipofisária o controle inibitório é o predominante. A dopamina de origem hipotalâmica é o principal fator de inibição da secreção de PRL pelos lactotrofos e age ligando-se a receptores dopaminérgicos específicos (FITZGERALD, DINAN, 2008; MURAO et al., 2004). Outros fatores hipotalâmicos como GABA,

somatostatina e calcitonina também desempenham papel de inibidores secundários (FREEMAN et al., 2000). Em contrapartida, a secreção de PRL também pode ser estimulada por fatores de liberação, como o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), serotonina, ocitocina e algumas citocinas (FREEMAN et al., 2000).

Em humanos, a concentração plasmática basal de PRL é mais alta durante o sono e menor durante o estado de vigília. Os níveis séricos normais, tanto em homens quanto em mulheres (não grávidas), podem variar de 2 a 20 ng/mL, atingindo valores 10 a 20 vezes superiores durante a gravidez. Na lactação, os níveis PRL geralmente não ultrapassam 200ng/mL.

1.3.1 Receptor de Prolactina (PRLR)

Assim como ocorre com todos os outros hormônios, o passo inicial para que a PRL execute suas ações fisiológicas, é a sua ligação aos receptores de membrana específicos, denominados receptores de PRL (PRLR) (BOLE-FEYSOT et al., 1998). Esses receptores são membros da superfamília de receptores de citocinas classe I, possuindo, portanto uma série de características em comum com receptores de citocinas clássicos (UEDA, 2006).

O receptor de PRL (PRLR) é caracterizado por uma proteína transmembrana, composta por três domínios (extracelular, transmembrana e intracitoplasmático), isenta de atividade autofosforilativa, e que necessita da ligação entre o ligante e duas subunidades do receptor, em sítios distintos, para que haja sua ativação, processo o qual é denominado “dimerização” (POSNER et al., 1975; BOLE-FEYSOT et al., 1998) (Figura 2).

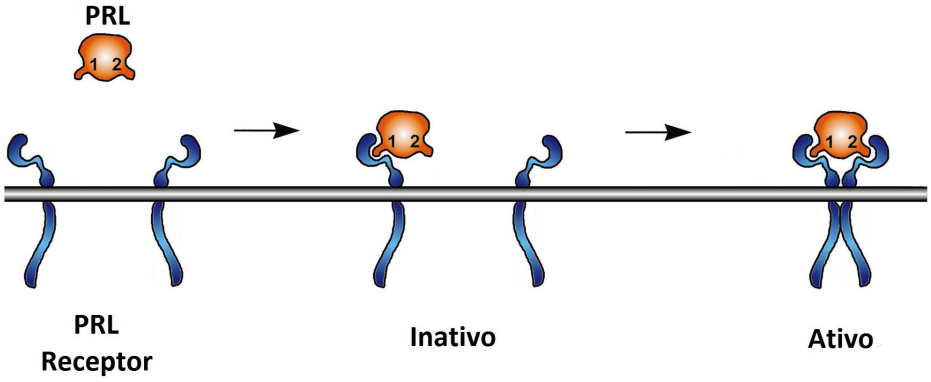


Figura 2 - Representação ilustrativa do processo de dimerização entre a PRL e o seu receptor (PRLR). O hormônio interage com o receptor através do sítio de ligação 1, formando um complexo inativo; posteriormente, a PRL liga-se a uma segunda subunidade do receptor através do sítio de ligação 2, resultando na formação de um complexo ativo (BOLE-FEYSOT et al., 1998).

Em humanos, o gene responsável por codificar o PRLR está localizado no cromossomo 5 e contém, no mínimo, dez éxons. Através de fatores pré-traducionais, como "*splicing*" alternativo, o gene do PRLR dá origem a várias isoformas de PRLR, que diferem no seu comprimento e composição da porção intracitoplasmática, e são classificadas em isoformas curtas, intermediárias e longas (BEN-JONATHAN et al., 1996). Formas solúveis também foram identificadas em humanos, onde apenas o domínio extracelular é secretado, não sendo possível concluir se esta isoforma seria derivada também de um produto de "splicing" ou da proteólise do PRLR íntegro (DAVIS, LINZER, 1989). Diversos trabalhos têm demonstrado que a expressão de diferentes isoformas de receptores pode variar em função do ciclo estral, gestação e lactação (CLARKE et al., 1993).

As porções extracelular e transmembrânica do PRLR não apresentam diferenças entre as isoformas, sendo altamente conservadas entre as espécies, assim como a porção intracitoplasmática proximal à membrana celular, denominada

de “Box 1”. A integridade desta região é essencial para a indução da fosforilação e ativação da JAK 2 (*Janus family of tyrosine kinase tipo 2*), a principal via de sinalização intracelular da PRL. As tirosinas fosforiladas no complexo receptor-JAK 2 formam sítios de ligação para diversas proteínas sinalizadoras, como as STATs 1 a 5 (Signal Transducers and Activators of Transcription tipos 1 a 5), que são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes. Após a ligação ao complexo receptor-JAK 2, as STATs também são fosforiladas pela JAK 2. Posteriormente, as STATs se separam do complexo receptor-JAK 2, se homodimerizam ou heterodimerizam com outras STATs e movem-se em direção ao núcleo, onde ativam a transcrição gênica (FREEMAN et al., 2000; GOFFIN et al., 2002) (Figura 3 e Figura 4). A desativação desse sistema JAK-STAT ocorre através da degradação dos receptores, da defosforilação das tirosinas presentes nos receptores-JAK 2 e da síntese dos SOCSs *(Suppressors of Cytokine-Signaling*) (GOFFIN et al., 2002).

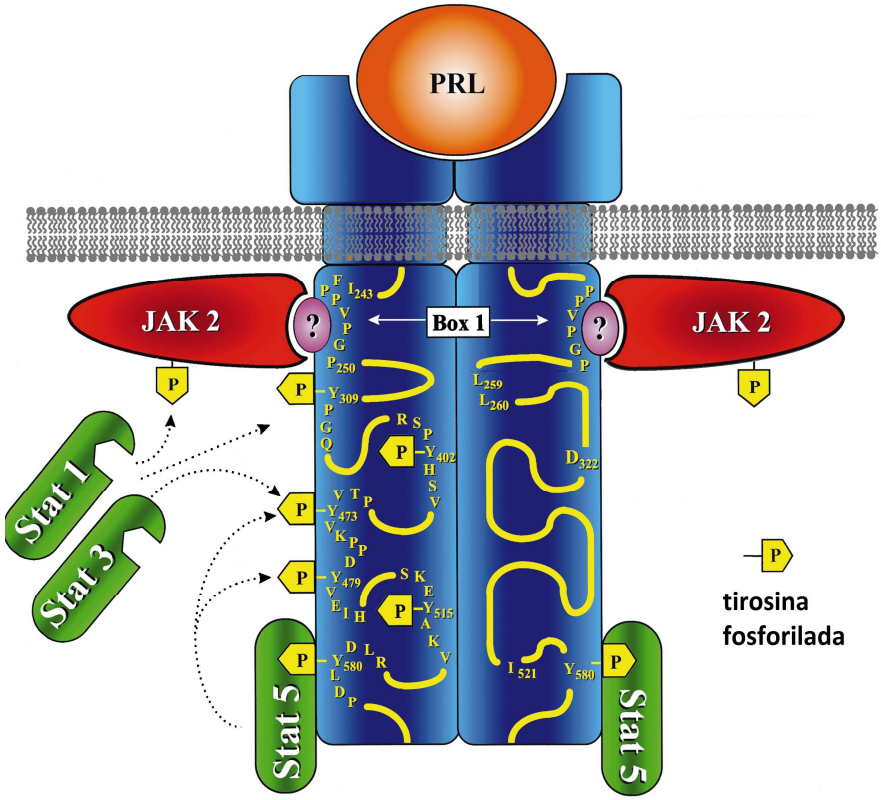


Figura 3 - Representação estrutural do domínio citoplasmático da forma longa do PRLR. A região Box-1, próxima à membrana, é comum a todas as isoformas de receptores, sendo necessária para a ligação com JAK2; não se sabe, contudo se essa ligação é direta ou necessita de uma proteína adaptadora (BOLE-FEYSOT et al., 1998; UEDA, 2006).

Os sítios de ligação e os receptores de PRL são amplamente distribuídos pelas células e tecidos dos mamíferos e demais vertebrados, podendo ser identificados em locais como hipófise, fígado, córtex adrenal, rins, ovários, testículos, glândulas mamárias, epiderme, ilhotas pancreáticas, pulmões, cérebro e também em células do sistema imune como linfócitos T e B e macrófagos (GALA, 1991; PELLEGRINI et al., 1992; DARDENNE et al., 1994; LEITE DE MORAES et al., 1995; ROOIJIMAN et al., 1996).

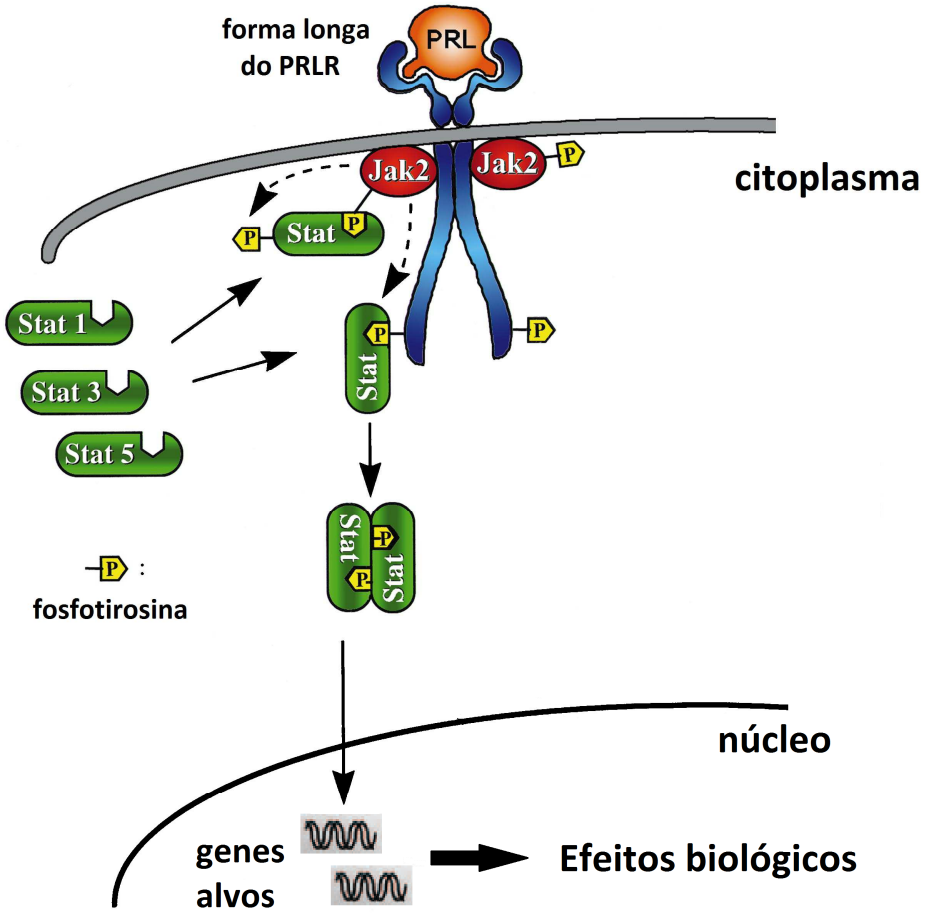


Figura 4 - Representação esquemática da via de sinalização JAK-STAT do PRLR (BOLE-FEYSOT et al., 1998; UEDA, 2006).

1.3.2. PRL Extra-hipofisária

Em 1991, Nagy e Berczi demonstraram que além da PRL produzida nos lactotrofos localizados na porção anterior da hipófise, há também a PRL extra-hipofisária, produzida e secretada por outras células em diferentes órgãos. Os autores relataram que ratas hipofisectomizadas apresentaram redução de 10 a 20% na atividade lactogênica, em comparação com ratas controles, e dentro de dois

meses, essa atividade aumentou gradualmente até 50% em relação aos controles. No entanto, os pesquisadores também demonstraram que a imunoneutralização da PRL com anticorpos anti-PRL, nessas mesmas ratas hipofisectomizadas reduziram acentuadamente a atividade lactogênica, causando ainda múltiplas complicações imunológicas e a morte (NAGY, BERCZI, 1991). Os resultados obtidos por esse importante trabalho, além de elucidar as diversas funções vitais da PRL, levantou também a possibilidade de que a PRL extra-hipofisária compensaria, pelo menos em partes, a existência de uma deficiência na produção da PRL hipofisária.

Além das células da hipófise, a expressão do gene e consequentemente a síntese da PRL também podem ocorrer em vários outros sítios, tais como: cérebro, endométrio, decídua, glândula lacrimal, timo, baço, células epiteliais mamárias, fibroblastos, linfócitos circulantes, células linfóides da medula óssea, entre outros, podendo ser encontrada também em compartimentos fluídos como leite materno, líquido céfalo raquidiano, suor e líquido amniótico (BEN-JONATHAN et al., 1996).

Ao contrário da PRL hipofisária, que age por via clássica, ou seja, uma vez secretada pela glândula, é transportada via circulação agindo em células-alvo através dos receptores específicos e desencadeando os eventos atribuídos ao hormônio como a lactação, a PRL extra-hipofisária pode atuar de diversas maneiras, agindo como citocina, fator de crescimento, neurotransmissor e imunomodulador (BOLE-FEYSOT, et al., 1998). A síntese local permite que a PRL atue diretamente nas células adjacentes (ação parácrina) ou nas próprias células que a produzem (ação autócrina), sem afetar, no entanto, a concentração sérica do hormônio.

1.3.3 Prolactina e suas ações

Além da sua função na fisiologia endócrina da mama durante a gravidez e lactação, a prolactina exerce várias outras ações fisiológicas nos vertebrados, sendo esta diversidade de efeitos atribuída a três componentes: polimorfismo estrutural, locais de produção (hipofisária e extra-hipofisária) e vias de sinalização intracelular divergentes (BEN-JONATHAN et al., 1996).

A influência da PRL sobre a regulação do balanço hidroeletrolítico em mamíferos é descrita por alguns autores que, em seus trabalhos, demonstraram que o hormônio é capaz de causar a redução da excreção renal de Na^+ e K^+ (RICHARDSON, 1973), a diminuição dos níveis de Na^+ e Cl^- no suor (ROBERTSON, et al., 1986), o aumento da absorção de água e sal em todas as regiões do intestino (MAINOYA, 1975) e ainda induzir a redução do volume do líquido amniótico (JOSIMOVICH et al., 1977). Já em relação aos efeitos sobre a proliferação celular, DUNCAN, GOLDMAN (1985) determinaram a capacidade da PRL em estimular o crescimento de melanócitos e queratinócitos em mamíferos (GIROLOMONI et al., 1993), enquanto outros autores sugeriram o papel funcional da PRL sobre os hepatócitos, principalmente devido à elevada expressão de PRLR no fígado (BUCKLEY et al., 1988; CROWE et al., 1991; PICCOLETTI et al., 1994). Há ainda, evidências que relataram o envolvimento da PRL na indução da maturação pulmonar no feto e na produção de surfactante (HAMOSH, HAMOSH, 1977; JOHNSON et al., 1985).

Os efeitos do hormônio sobre o sistema endócrino e o metabolismo vão além da sua ação sobre a lactação. De acordo com Sorenson et al. (1987), a PRL afeta diretamente a função pancreática, diminuindo o limiar glicêmico para a

produção da insulina e aumentando a secreção da mesma. Sob ação da PRL, a síntese de esteróides pela glândula adrenal também é alterada, especialmente o dehidroepiandrosterona (DHEA), o cortisol e aldosterona (GLASOW et al., 1996; HIGUCHI et al., 1984).

De forma geral, a PRL é fundamental para a reprodução tanto de roedores, como de seres humanos, dado que a lactação representa uma continuidade do processo reprodutivo. No entanto, a participação do hormônio em outros componentes do eixo reprodutivo é altamente específica e variável entre diferentes espécies. Em roedores, o nível de PRL sofre alterações durante o ciclo estral e apresenta-se elevado nos primeiros meses da gravidez, tendo, posteriormente, seus níveis diminuídos e suas funções substituídas pelos lactogênios placentários, e voltando a aumentar após o nascimento (BEN-JONATHAN et al., 1996). Em virtude de sua ação luteotrófica, permitindo, inicialmente, o estímulo e manutenção da produção de progesterona pelo corpo lúteo, a PRL é essencial para uma gravidez bem sucedida nos roedores.

Entretanto, o envolvimento da PRL na reprodução humana, com exceção da lactação, ainda não foi totalmente elucidado. Se por um lado, a PRL não é importante no ciclo menstrual e não exerce influência nenhuma sobre o corpo lúteo e suas funções, por outro, a gravidez humana é caracterizada pelo aumento considerável na produção de PRL pela hipófise materna e fetal, assim como pela decídua. O desafio para pesquisas futuras é tentar esclarecer qual o papel desempenhado pela PRL durante a gestação humana, principalmente no suporte à implantação do ovo já fertilizado, na inibição da ovulação, na prevenção da rejeição imunológica ao embrião, no crescimento e desenvolvimento fetal e no início do parto (BEN-JONATHAN et al., 2008). Infelizmente, não há modelos experimentais

adequados e com semelhanças significativas com os seres humanos, o que torna a tarefa extremamente difícil.

Determinadas condições patológicas que resultam em distúrbios nos níveis de PRL circulante, podem causar efeitos indesejáveis e prejudiciais sobre o sistema reprodutor. A hiperprolactinemia é frequentemente associada com amenorréia, anovulação e diminuição da libido em mulheres. Até 20% de amenorréia secundária nas mulheres é atribuída à PRL elevada (PETTY, 1999; YAZIGI et al., 1997). Os mecanismos mais prováveis, pelos quais os altos níveis séricos desse hormônio induzem alterações menstruais, ocorrem através da inibição da produção de GnRH e da interferência da PRL no desenvolvimento folicular e na produção de progesterona (BEN-JONATHAN et al., 1996). Em roedores, a hiperprolactinemia causada pelo uso crônico de drogas ou pela deficiência nos receptores dopaminérgicos resulta em irregularidades do ciclo estral, mas sem maiores efeitos sobre a fertilidade (KELLY et al., 1997; MORO et al., 2001).

Nos homens, níveis endógenos de PRL muito elevados induzem o hipogonadismo, reduzem a produção de GnRH e também de testosterona, causando disfunção erétil (DE ROSA et al., 2003).

1.3.4 Prolactina e Imunomodulação

A elucidação do papel da PRL como importante fator na modulação do sistema imune tem sido alvo de diversas pesquisas (REBER, 1993; WEIGENT, 1996; FILIPIN et al., 2011), porém a real implicação deste “hormônio-citocina” nas distintas interações do complexo neuro-imuno-endócrino não está totalmente estabelecida.

Em 1972, Chen e seus colaboradores foram os primeiros pesquisadores que demonstraram a relação da PRL com a resposta imune. Nesse estudo, a PRL exógena melhorou a função tímica em camundongos anões com deficiência na produção desse hormônio (CHEN et al., 1972); alguns anos depois, Nagy e Berczi (1978), constataram que a hipofisectomia ou a supressão da secreção de PRL com bromocriptina, um agonista dopaminérgico, conduziram à atenuação da imunidade humoral e celular, que por sua vez foi revertida pelo tratamento com PRL. Posteriormente, outros trabalhos demonstraram que o hormônio induz a proliferação celular, sendo capaz de reverter quadros de anemia, leucopenia e trombocitopenia (NAGY, BERCZI, 1989).

A expressão do RNAm da PRL e do seu receptor específico (PRLR) em diversas linhagens de células do sistema imunológico, como linfócitos, esplenócitos, timócitos e macrófagos, são pontos importantes que permitem a atuação da PRL como agente modulador da resposta imune (PELLEGRINI et al., 1992; GAGNERAULT et al., 1993; WU et al., 1996).

Diversos autores demonstraram que a PRL atua como um fator mitogênico no sistema imune e age em sinergismo com a IL-2, promovendo a proliferação e diferenciação de células NK e a ativação de linfócitos T, além de estimular a produção de IFN-γ por estes dois tipos de células (CLEVENGER et al., 1990; MATERA et al., 1992; CESARIO et al., 1994; MATERA et al., 1999; MATERA, MORI, 2000; MATALKA, 2003; TOMIO et al., 2008). Os efeitos funcionais compartilhados e a redundância entre a PRL e a IL-2 ocorrem principalmente, devido ao fato de que o receptor da IL-2 possui semelhanças estruturais com o receptor da PRL, ou seja, tanto o hormônio como a citocina podem ser responsáveis pela ativação dos mesmos alvos (BAZAN, 1990; O'NEAL, YU-LEE, 1993). Dentre os

alvos comuns, compartilhados entre a IL-2 e a PRL, estão os fatores de transcrição nuclear IRF-1, Stat-5b e o NF-κB, que desempenham funções imunológicas importantes (DUNCAN et al., 1996; YU-LEE, 1997; CLEVENGER et al., 1998; IMADA et al., 1998; LÓPEZ-MEZA et al., 2010).

Ainda em relação aos efeitos da PRL sobre os mecanismos ativadores da resposta imune, pode-se citar o seu estímulo sobre a produção de citocinas, como IL-12p40, IL-1 e IL-6 (PEEVA, ZOUALI, 2005; CHÁVEZ-RUEDA et al., 2005), e também sobre a ativação de macrófagos, elevando a atividade fagocítica e citotóxica destas células através do aumento na produção de NO (MELI et al., 1997; BOLANDER, 2001, 2002; TRIPATHI, SODHI, 2007). Além disso, Krishnan e colaboradores (2003) afirmaram que a PRL eleva a sobrevida de células T, quando estas são expostas a grandes quantidades de glicocorticoides, sendo também capaz de estimular a síntese de DNA celular e inibir a apoptose (BERCZI et al., 1991; MATERA et al., 1992; BISWAS et al., 2006).

Alguns autores já demonstraram a possível influência da PRL sobre a resposta imune durante infecções causadas por microrganismos patogênicos. Meli et al. (1996) relataram o seu efeito protetor sobre camundongos infectados com *Salmonella thyphimurium*, enquanto Bayoumi et al. (2009) relataram que mulheres grávidas infectadas com *Plasmodium falciparum* apresentaram baixos níveis do hormônio quando comparadas ao grupo controle. Estudos de Dzitko e colaboradores descreveram o envolvimento da PRL com a evolução da toxoplasmose, e indicaram que o hormônio seria um importante fator imunorregulador envolvido na limitação da invasão do *T.gondii*, sendo capaz de inibir o processo de penetração e proliferação intracelular do parasita. De acordo com os autores, níveis fisiológicos elevados do hormônio poderiam estar diretamente relacionados com a redução da

soroprevalência da doença em mulheres e o aumento da concentração plasmática da PRL durante a gravidez limitaria a reativação e o descontrole da infecção (DZITKO et al., 2008; DZITKO et al., 2010; DZITKO et al., 2012).

A PRL desempenha funções importantes na regulação da resposta imune humoral e celular, tanto em condições fisiológicas, quanto em estados patológicos, como as doenças autoimunes (DE BELLIS et al., 2005; COHEN-SOLAL et al., 2008). Devido à alta incidência destas doenças entre as mulheres em idade fértil, diversos autores afirmam que assim como os estrogênios, a PRL também pode estar envolvida no desenvolvimento de patologias autoimunes (DE BELLIS et al., 2005; ORBACH, SHOENFELD, 2007). Estudos de McMurray (2001) demonstraram que pacientes com hiperprolactenemia desenvolveram doenças reumáticas autoimunes. E segundo Leaños-Miranda et al. (2001), algumas mulheres desenvolveram naturalmente autoanticorpos durante a gestação, provavelmente devido ao estado de hiperprolactenemia.

Apesar de tantas evidências na literatura, ainda há muitas controvérsias sobre as propriedades imunológicas da PRL. Estudos em modelos *knockout,* demonstraram que tanto a deficiência do gene da PRL, quanto do seu receptor em camundongos, não causou alteração alguma na hematopoiese, sugerindo que a PRL não desempenha papel crítico no desenvolvimento de linfócitos e da homeostase (HORSEMAN et al., 1997; BOUCHARD et al., 1999). Além disso, Oberbeck e seus colaboradores (2003) observaram uma diminuição considerável da sobrevida e uma profunda supressão das funções da resposta imune celular de ratos suplementados com PRL, durante uma inflamação sistêmica causada pela sepse.

Estudos de Matera (1992, 1997) indicaram um duplo papel regulatório para PRL e concluíram que as concentrações do hormônio, a variedade de isoformas, a existência de várias subunidades do receptor, bem como a complexidade da sua sinalização intracelular podem explicar a especificidade de sua ação sobre diferentes células-alvo.

Os sistemas imune, endócrino e nervoso atuam diretamente sobre os mecanismos celulares e a prolactina é comprovadamente um hormônio neuroendócrino com participação importante na imunorregulação. Tendo em vista estas características imunomoduladoras, o estudo proposto baseou-se na hipótese de que a administração da PRL poderia potencializar a reposta imune do hospedeiro durante a fase aguda da doença de Chagas experimental, e consequentemente, aumentar a resistência à infecção.

2. Justificativa

Apesar de todo o avanço científico e das importantes pesquisas desenvolvidas no Brasil e em outros países, a doença de Chagas ainda é considerada uma doença negligenciada e sem cura definitiva. O tratamento dos pacientes na fase crônica busca limitar a doença e aumentar a taxa de sobrevivência, sendo baseada apenas no controle dos sintomas, melhora na qualidade de vida e redução das complicações. As perspectivas se tornam mais complicadas, pois, além da inexistência de uma vacina eficaz na prevenção da infecção, a quimioterapia existente, baseada em compostos nitroheterocíclicos, como o benzonidazol e o nifurtimox, apresenta muitas reações adversas, sendo mais efetiva na fase inicial da doença.

Nas últimas décadas, a avaliação de substâncias alternativas aos fármacos tradicionais e a busca de novas estratégias quimioterapêuticas têm se constituído o foco de diversas pesquisas experimentais. Sabe-se que determinados fatores relacionados ao hospedeiro influenciam a efetividade do tratamento, como estado nutricional, resposta imune e idade. Adicionalmente, aspectos ligados ao parasita também podem determinar a eficácia da farmacoterapia, como por exemplo, a diversidade filogenética de *T.cruzi.* Neste contexto, o estabelecimento das possíveis interações entre os sistemas imunológico e endócrino durante a infecção por *T.cruzi* e a avaliação da influência dos hormônios sobre o curso da doença de Chagas são os principais objetivos do nosso grupo de pesquisa.

A modulação da resposta imune pela prolactina se fundamenta em estudos anteriores realizados com outros modelos experimentais, incluindo o homem, que demonstraram os efeitos deste hormônio sobre vários parâmetros imunológicos. Entretanto, o envolvimento da prolactina com as infecções

parasitárias, entre elas a doença de Chagas, ainda não está completamente elucidado e deve ser investigado para a melhor compreensão da infecção e seus processos patológicos.

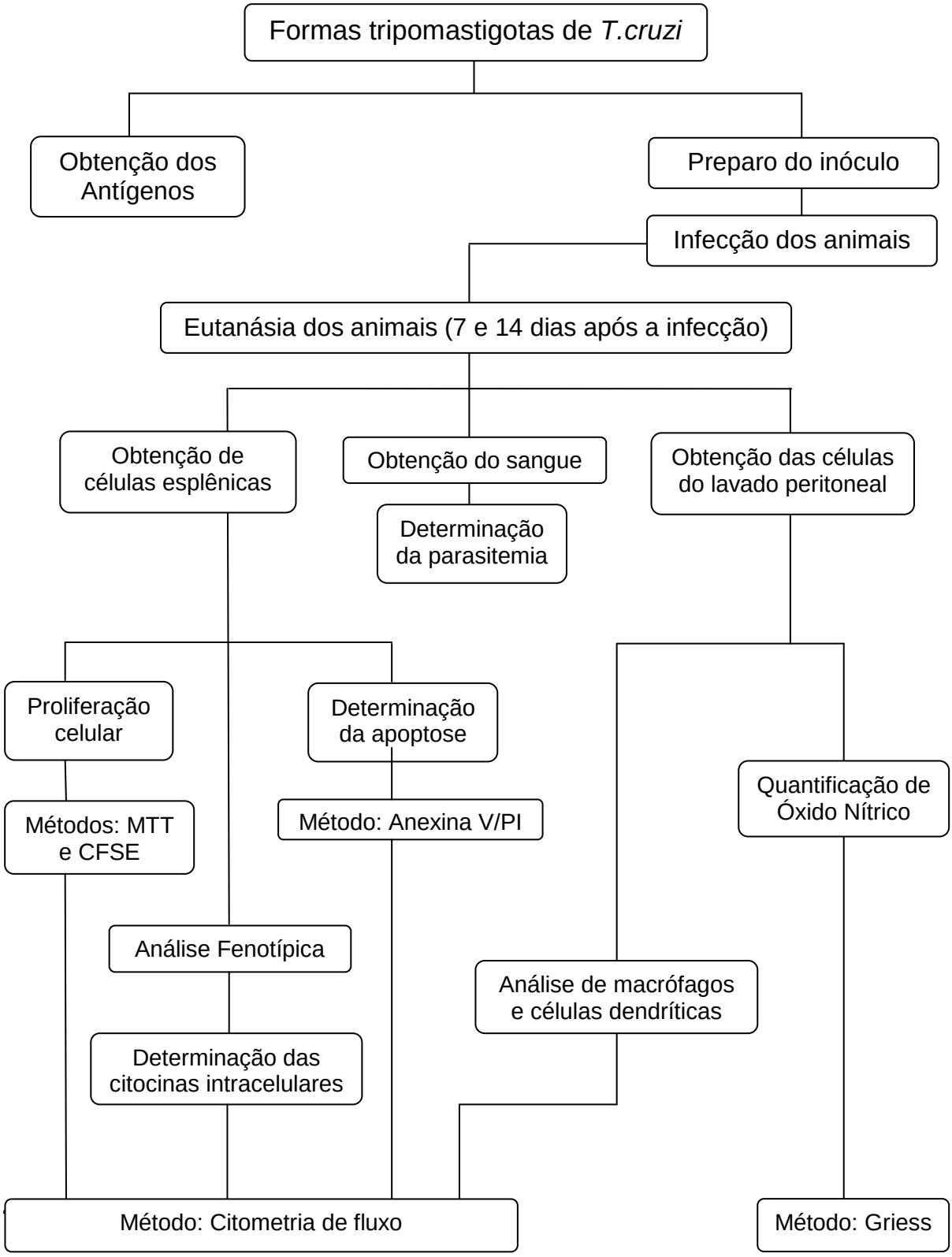
3. Objetivos

O objetivo central desta tese consistiu em analisar os efeitos da administração da prolactina sobre a resposta imune de ratos Wistar jovens infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Para isto, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Intensidade da infecção, através da quantificação de parasitas sanguíneos;
- A participação e o perfil de ativação das células da resposta imune inata e adaptativa durante a fase aguda da infecção experimental, utilizando ensaios de linfoproliferação *in vitro* e análises dos fenótipos apresentados pelos esplenócitos e células coletadas do lavado peritoneal;
- Análise dos níveis de apoptose de esplenócitos;
- Dosagem de óxido nítrico em culturas de células coletadas do lavado peritoneal;
- Dosagem de citocinas e da quimiocina MCP-1, produzidas por linfócitos T do baço, após breve estimulação *in vitro*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de execução dos experimentos



4.2 Animais utilizados

Foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente 04 semanas, pesando cerca de 100 gramas, provenientes do Biotério Geral da Coordenadoria do Campus de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de cinco por gaiola. A fim de se evitar o acúmulo de amônia proveniente da urina dos animais, a cama de maravalha era trocada três vezes por semana. Para alimentação dos animais foi fornecida ração específica para roedores e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética local (protocolo n°09.1.279.53.6).

4.3 Grupos Experimentais

Grupos	*Sem tratamento*	*Tratamento com PRL*
CONTROLE - 7º dia	**n = 5**	**n = 5**
INFECTADO - 7º dia	**n = 5**	**n = 5**
CONTROLE - 14º dia	**n = 5**	**n = 5**
INFECTADO - 14º dia	**n = 5**	**n = 5**

Grupos Controles

Controle sem tratamento (C) - 7° e 14° dias

Controle tratado com Prolactina (CP) - 7° e 14° dias

Grupos Infectados pela cepa Y de *T.cruzi*

Infectado sem tratamento (I) - 7° e 14° dias

Infectado tratado com Prolactina (IP) - 7° e 14° dias

4.4 Protocolo Experimental

4.4.1 Infecção experimental

Os animais dos grupos infectados foram inoculados intraperitonealmente (i.p) com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*. A cepa Y de *T. cruzi* foi isolada por SILVA, NUSSENZWEIG (1953), através do xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos Swiss (não isogênicos), através de repiques semanais de sangue infectado. A cepa Y possui morfologia delgada com picos parasitêmicos precoces, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA, SCORZA, 1972). Quando inoculada em ratos, o padrão da curva parasitêmica se mantém semelhante aos dos roedores de menor porte, com um pico compreendido entre o 7° e 14° dia da infecção (UYEMURA et al., 1 995), dependendo do número de parasitas inoculado, idade e sexo do animal. Após esse período há uma redução da parasitemia.

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

Os antígenos de tripomastigotas utilizados nos ensaios de proliferação celular *in vitro,* foram preparados a partir de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidas de células LLCMK2 ("*monkey kidney fibroblast cell line*"). As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal em estufa, a 37ºC em atmosfera úmida a 5% de CO_2, até obter-se uma cultura uniforme e confluente.

Após 5 dias, as formas tripomastigotas foram coletadas e centrifugadas a 40g a 4°C durante 10 minutos, para a separação das células debris, seguida por outra centrifugação a 700g a 4°C por 10 minutos. O sedimento resultante, contendo as formas tripomastigotas vivas, foi lavado 5 vezes em PBS gelado (pH 7,2) a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os parasitas ressuspensos em 1,5mL de PBS gelado, sendo então submetido a três ciclos de congelamento-aquecimento a -80ºC e 37ºC, respectivamente. Em seguida, os parasitas lisados foram submetidos a cinco ciclos de 30 segundos de sonicação cada um (20KHz, 30 watts). A solução resultante foi centrifugada a 20000*g* durante 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana 0,45µm, sendo o produto da filtração congelado a -80ºC. Após vários processos de obtenção de frações solúveis do parasito, foi realizado um “pool” das diferentes extrações e a quantidade de proteínas dosadas pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão. Alíquotas do antígeno foram congeladas a -80ºC para posterior uso em experimentos (MARCIPAR et al., 2003; MARTIN, TARLETON, 2005).

4.4.3 Tratamento com prolactina

Cada animal foi tratado com 100µg de PRL ovina (Sigma-Aldrich), diluídos em 0,1mL de solução fisiológica 0,9% estéril, sendo administrados por via subcutânea, uma vez ao dia, ao longo de todo experimento (RYNÍKOVÁ et al., 1988; ZELLWEGER et al., 1996; OBERBECK et al., 2003; FILIPIN et al., 2011). O esquema de tratamento começou imediatamente após a infecção.

4.4.4 Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados nos 7º e 14º dias após o inoculo infectante, período correspondente à fase aguda da doença.

4.4.5 Eutanásia e Coleta de Sangue

Cada animal foi anestesiado previamente com Tribromoetanol 2,5% administrado intraperitonealmente (dose de 250mg/Kg/animal) e posteriormente morto por decapitação. Após a eutanásia, foram coletados cerca de 2,0mL de sangue em tubo contendo EDTA, para determinação da parasitemia.

4.5 Contagem de parasitas

A determinação da parasitemia sanguínea foi feita pelo método de BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5µL de sangue em lâmina, cobrindo-a com lamínula de 22 x 22mm. Determina-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos. O número encontrado é multiplicado por um fator, calculado e determinado para cada microscópio e objetiva, que leva em consideração o número de campos microscópicos existentes na área da lamínula.

4.6 Caracterização fenotípica e funcional de células obtidas a partir do lavado peritoneal, através de Citometria de Fluxo

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

Após a contagem, a concentração foi ajustada para $2x10^6$ células/poço, sendo as mesmas distribuídas em placas de 96 poços. As suspensões celulares foram incubadas com *Fcblock* (BD Biosciences Pharmingen), por 20 minutos a 4ºC. Ao término da incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado, centrifugadas a 1800 rpm por 3 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido e procedeu-se à marcação das células com os anticorpos monoclonais, para determinação das subpopulações. Todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen, e utilizados na diluição 1:100µL. Posteriormente à incubação de 30 minutos no escuro a 4℃, as células foram lavadas com tampão PBS (1x), centrifugadas e ressuspensas em 150µL de tampão *Cell Staining Buffer*. Após a transferência para tubos apropriados, as amostras foram analisadas através de citometria de fluxo em Citômetro BD FACS-Canto (BD Biosciences). A análise dos resultados foi executada usando o programa FACSDiva (BD).

Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica das células peritoneais:

Anticorpo	Clone	Concentração
Anti-CD11bc - PECy7	OX-32	0,2mg/mL
Anti-CD80 - PE	3H5	0,2mg/mL
Anti-CD86 - FITC	24F	0,5mg/mL
Anti-RT1B - PercP	OX-6	0,2mg/mL
Anti-macrophage subset - PE	HIS36	0,2mg/mL

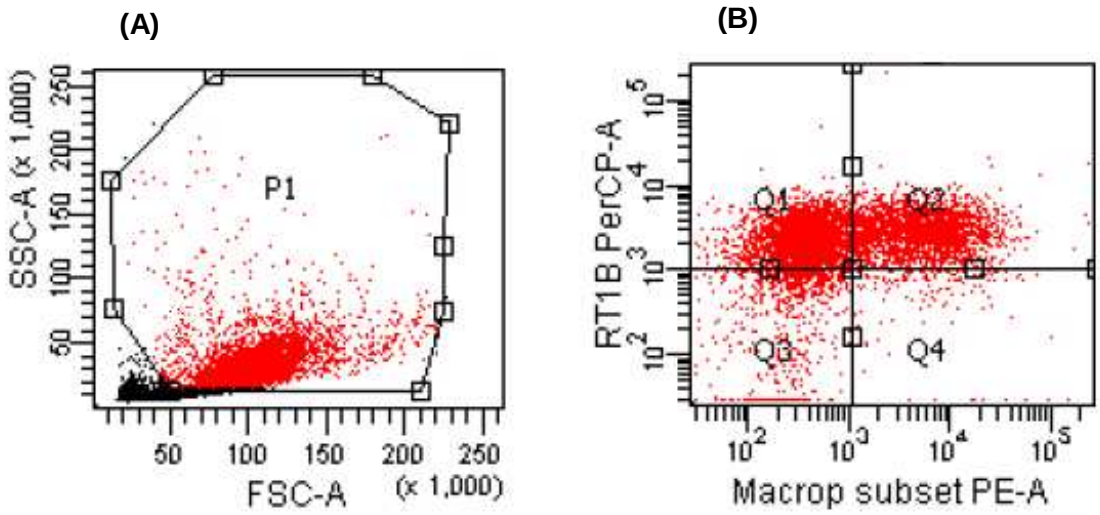


Figura 5 - Estratégia de aquisição de macrófagos, obtidos a partir do lavado peritoneal, de acordo com as características de tamanho e granulosidade **(A)**. Em **(B)**, o gráfico representativo em *dot plot* da expressão da molécula de RT1B em macrófagos peritoneais.

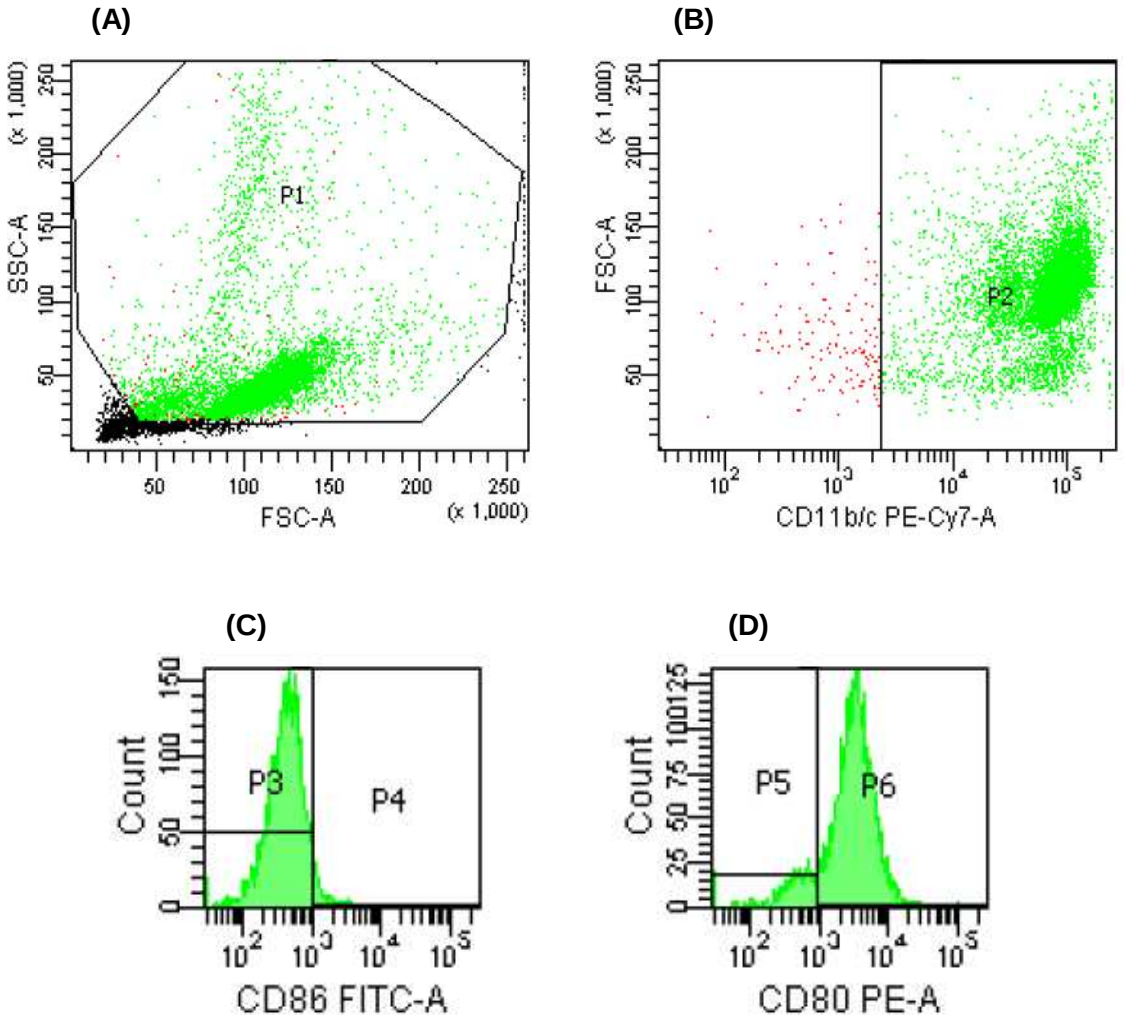


Figura 6 - Estratégia de aquisição das células apresentadoras de antígenos, de acordo com as características de tamanho e granulosidade **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo da expressão de CD11b/c. Figuras **(C)** e **(D)** ilustram histogramas representativos das populações de células apresentadoras de antígenos (CD11b/c^{+}), subdivididas em relação à expressão de CD86 e CD80, respectivamente.

4.7 Quantificação de Óxido Nítrico produzido por células obtidas a partir do lavado da cavidade peritoneal

Como o óxido nítrico possui um tempo de meia-vida muito curto, a determinação da produção deste radical por macrófagos foi mensurado através da formação do nitrito (NO_2^-), um produto de degradação estável e menos volátil.

A dosagem de nitrito acumulado no sobrenadante de culturas de células peritoneais foi realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Inicialmente, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (SUN et al., 2003).

Uma alíquota (100µL) da suspensão de células peritoneais preparada anteriormente foi distribuída em placa de 96 poços, contendo $2x10^6$ células/poço, sendo adicionados 100µL de LPS (10µg/mL) (*E. coli* sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich) aos poços estimulados. A placa foi levada à estufa contendo 5% de CO_2, durante 48 horas a 37ºC. Após este período, a placa foi centrifugada a 1800 rpm durante 6 minutos. Recolheu-se 100µL do sobrenadante e transferiu-se para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Griess (50µL de sulfanilamida 1% e 50µL de N-naftil-etilenodiamina 0.1% diluídos em solução de ácido fosfórico 5%), permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas, utilizando filtro de 540nm (Referência 0). As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando-se uma curva padrão de $NaNO_2$ de 200µM a 6µM (GREEN et al., 1982; TERENZI et al., 1995; HRUBY, BECK, 1997).

4.8 Preparo da suspensão de células provenientes do baço

O baço de cada animal foi removido cirurgicamente em condições assépticas, e transportado para uma placa de Petri pequena, contendo 5mL de RPMI-1640. A seguir, o órgão foi cuidadosamente macerado, para liberação das células, com o auxílio de peneiras para cultura celular. Em seguida, a suspensão foi transferida para tubos e submetida à centrifugação a 1800 rpm durante 6 minutos a 4℃. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento d e células adicionou-se 2mL de tampão hemolítico ACK (NH_4Cl 0,15M, $KHCO_3$ 1mM, Na_2EDTA 0,1mM), incubando-se por 2 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem, e centrifugação a 1800 rpm por 6 minutos, as células foram ressuspendidas em 10mL de RPMI-1640. A suspensão obtida permaneceu em repouso por 10 minutos a 4˚C para sedimentação de fragmentos tissulares, que a seguir foram removidos. Após homogeneização cuidadosa dos tubos, acrescentou-se 5µL desta suspensão, em 495µL de solução de Azul de Trypan (0,4%), procedendo-se a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Para cada animal foi preparada uma suspensão contendo $2x10^6$ células/poço em meio RPMI-1640.

4.9 Análise fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo

A suspensão preparada anteriormente foi utilizada para análise fenotípica dos linfócitos, através da técnica de citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidos contra antígenos de superfície destas células. Alíquotas de 100µL da suspensão de células esplênicas ($2x10^6$ células/tubo) foram distribuídas em tubos eppendorfs™ e incubadas com 100µL de *Fcblock* diluído em tampão de *Cell Staining Buffer*, por 20

minutos a 4°C. Ao final da incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado, centrifugadas a 1800 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspendido e as células marcadas com anticorpos monoclonais conjugados e submetidas à incubação de 30 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se tampão PBS (1x), sendo os tubos centrifugados novamente a 1800 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. Finalmente, as células foram ressuspensas em 150µL de tampão *Cell Staining Buffer* e transferidas para os tubos de leitura. Todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen, e utilizados na diluição 1:100µL em tampão *Cell Staining Buffer*.

As suspensões foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo BD FACS-Canto (BD Biosciences) que utiliza os detectores e canais de células adequados para leitura de cada fluorocromo As análises dos resultados foram executadas usando o programa FACSDiva (BD).

Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica dos esplenócitos:

Anticorpo	Clone	Concentração
Anti-CD3 - APC/FITC	1F4	0,2mg/mL;0,5mg/mL
Anti-CD4 - PE/PECy7	OX-38/OX-35	0,2mg/mL
Anti-CD8 - PercP	OX-8	0,2mg/mL
Anti-CD11a - FITC	WT.1	0,5mg/mL
Anti-CD11bc - PECy7	OX-42	0,2mg/mL
Anti-CD28 - PE	JJ319	0,2mg/mL
Anti-CD45RA - PE	OX-33	0,2mg/mL
Anti-CD80 - PE	3H5	0,2mg/mL
Anti-CD86 - FITC	24F	0,5mg/mL
Anti-CD161 - FITC	10/78	0,5mg/mL
Anti-RT1B - PercP	OX-6	0,2mg/mL
Anti-*Macrophage subset* - PE	HIS36	0,2mg/mL

Marcadores celulares analisados:

Descrição	Marcadores Celulares
Marcador de superfície celular da população de linfócitos T	CD3
Marcadores de superfície celular de subpopulações de linfócitos T	CD4 e CD8
Marcadores de superfície celular para moléculas coestimulatórias em APCs	CD80 e CD86
Marcador de superfície celular para molécula coestimulatória em células T	CD28
Marcadores de superfície celular da população de células NK	CD161
Molécula de adesão ao endotélio, família das integrinas	CD11a (LFA-1)
Marcador de superfície celular de macrófagos	Macrophage subset
Marcador de superfície celular da população de linfócitos B	CD45RA
Marcador de ativação celular	RT1B (MHC II)
Marcador de superfície celular de APCs	CD11bc

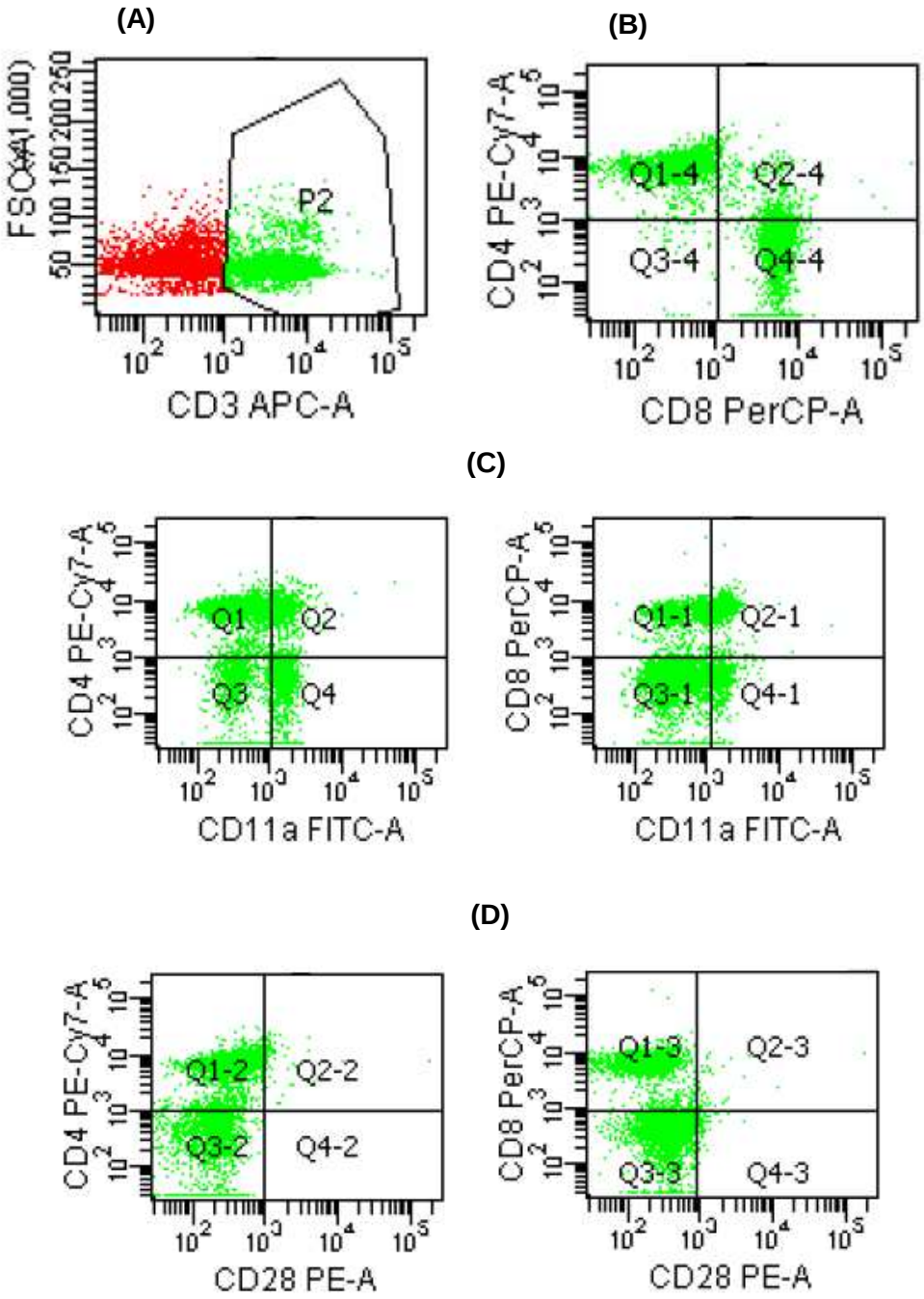


Figura 7 - Estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e expressão de CD3 **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo das subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Figuras **(C)** e **(D):** gráficos em *dot plot* das subpopulações de linfócitos, subdivididas em relação à expressão de CD11a e CD28, respectivamente.

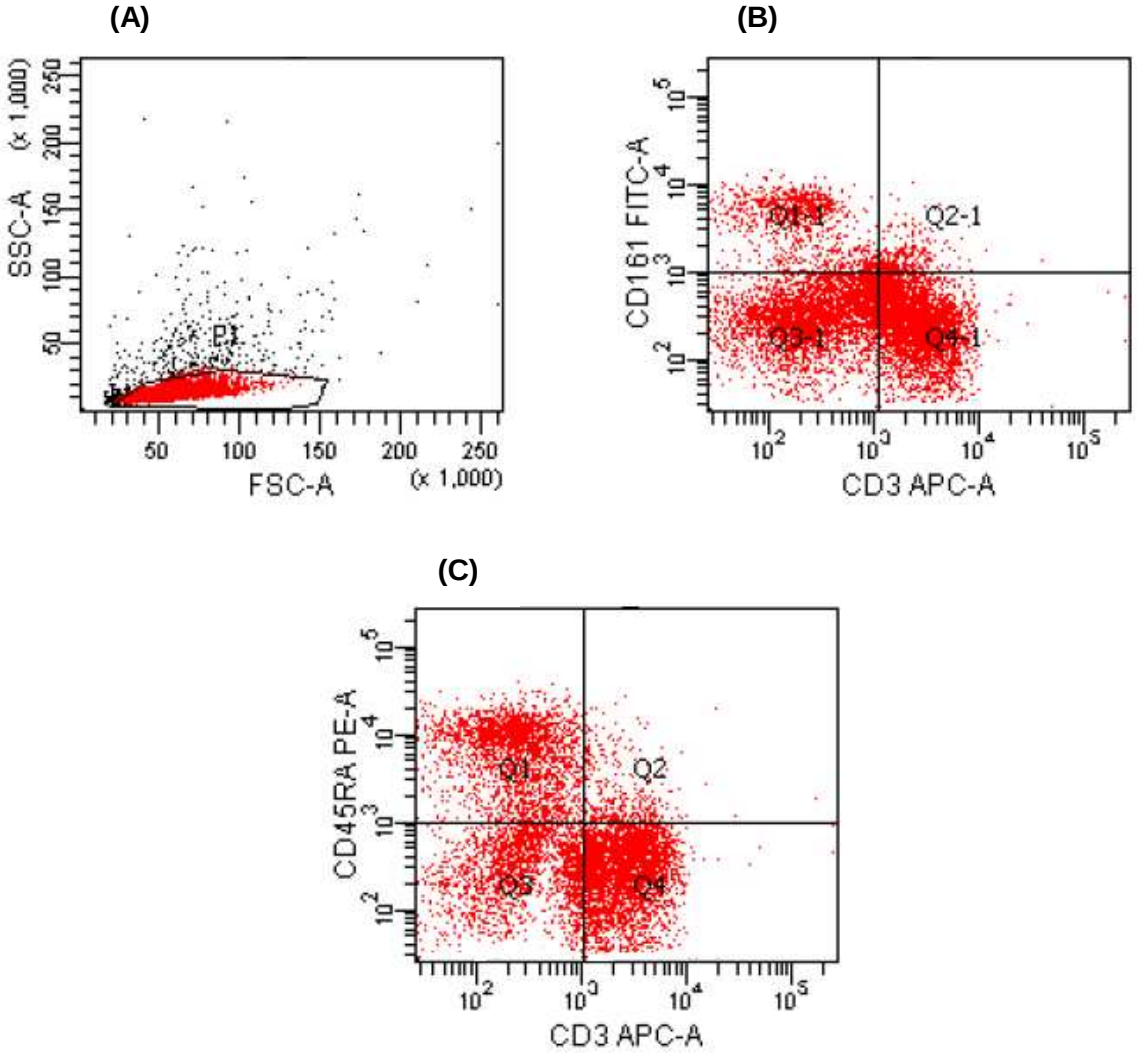


Figura 8 - Seleção da população celular de acordo com as características de tamanho e granulosidade **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo das populações de células esplênicas, expressando $CD161^+$ (NK) e $CD3^+CD161^+$ (NKT). Em **(C)**, gráfico em *dot plot* representativo da expressão da molécula CD45RA.

4.10 Detecção do processo de apoptose por citometria de fluxo - Marcação com anexina-V e iodeto de propídeo

A apoptose é um processo fisiológico que desempenha um papel fundamental no controle de diversos processos vitais (BERGANTINI et al., 2005; BRAS et al., 2005).

A exteriorização da molécula de fosfatidilserina na membrana plasmática é um dos eventos iniciais que ocorre durante o processo de apoptose. As células viáveis mantêm os fosfolipídios assimetricamente distribuídos na membrana plasmática, com a molécula de fosfatidilserina voltada para o citoplasma. A anexina-V conjugada à fluoresceína (FITC), ao se ligar à fosfatidilserina exposta na superfície celular permite a identificação das células apoptóticas. O iodeto de propídeo (PI), por sua vez, é um corante vital que é incorporado entre bases nucleicas em células que perderam a integridade da membrana celular, detectando assim células em processo de morte por apoptose tardia (GATTI et al., 1998).

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

Para a caracterização dos diferentes estágios de apoptose, as células esplênicas obtidas foram lavadas com tampão de ligação da anexina-V diluído 1:10 em água purificada (*Annexin Binding Buffer* - BD Bioscences Pharmigen) e então centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Adicionou-se às suspensões celulares, 100µL do tampão de ligação e 1µL de cada

marcador: anexina-V (FITC) e de iodeto de propídio (PI). As amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foram adicionados a todos os tubos 400µL do mesmo tampão, e acondicionados a 4℃ e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo.

Paralelamente, foi avaliado o perfil apoptótico dos grupos experimentais, após incubação das células obtidas por um período de 4 horas, utilizando como estímulo antígenos de *T. cruzi*. As culturas foram realizadas em placas de 96 poços, com fundo redondo, e como controle positivo foi utilizado Estaurosporina 1mM (Sigma-Aldrich). Para avaliação dos estágios de apoptose, as células em estudo foram submetidas ao mesmo protocolo descrito anteriormente.

As amostras foram analisadas utilizando o equipamento BD FACS-Canto (BD Biosciences). A análise dos dados obtidos foi realizada no software FACSDiva (BD), possibilitando a classificação das células em: viáveis (Anexina-V-FITC e PI negativo), apoptose inicial (anexina-V-FITC positivo e PI negativo) e apoptose avançada (Anexina-V-FITC e PI positivo).

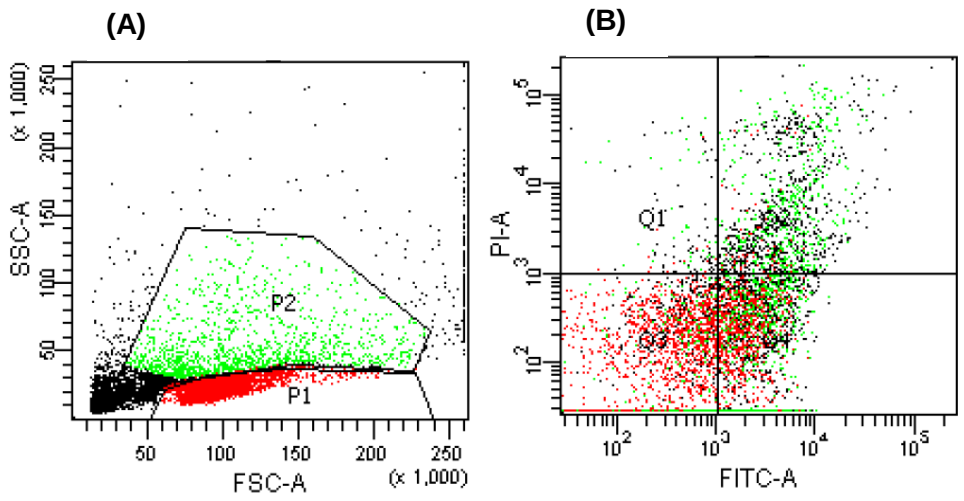


Figura 9 - Estratégia da seleção da população células esplênicas, para caracterização dos estágios de apoptose **(A)**. Em **(B)**, gráfico em *dot plot* representativo dos estágios de apoptose, utilizando-se Anexin-V (FITC) e PI.

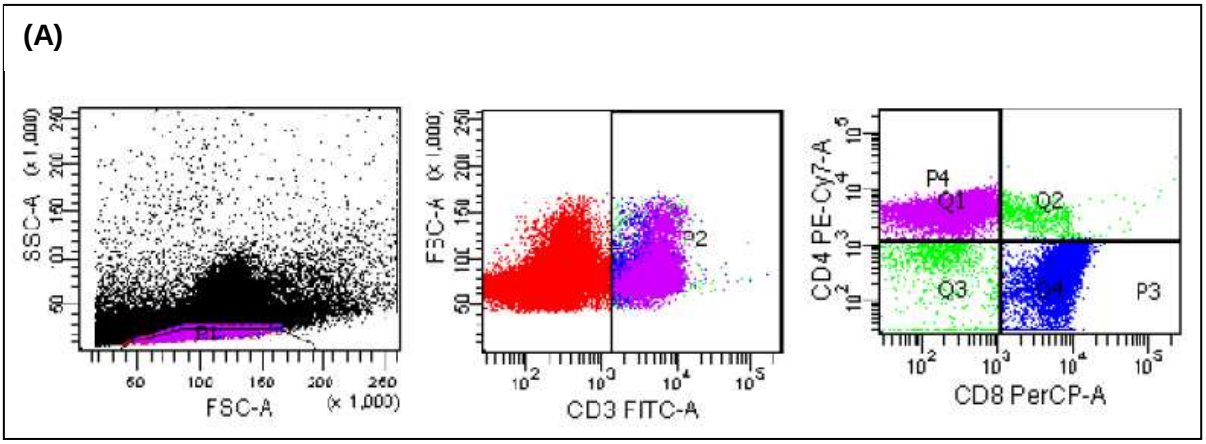
4.11 Detecção das citocinas intracelulares IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α, e quimiocina MCP-1

Alíquotas de 100µL, contendo $2x10^6$ células/poço, da suspensão de células esplênicas isoladas e obtidas como descrito no item 4.8, foram distribuídas em placa de 96 poços, com fundo redondo. Alguns poços foram estimulados com 5µg/mL de forbol miristato acetato (PMA/Sigma-Aldrich) e 1µg/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich), sendo que outra parte dos poços não recebeu estímulo. As células esplênicas foram incubadas por 4 horas, a 37℃, em atmosfera úmida com tensão constante de CO_2 (5%). Após este período, adicionou-se Brefeldina A (Sigma-Aldrich) na concentração de 10µg/mL, a todas as cavidades, sendo a placa novamente incubada, nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO_2, por mais 2 horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares em função do seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite o acúmulo destas citocinas no complexo de Golgi e consequentemente um aumento do sinal, que poderá ser detectado pelo citômetro de fluxo. Após o término da incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 1800 rpm por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e as suspensões de células, tanto estimuladas quanto não estimuladas, foram ressuspensas em *Stain Buffer BSA* (gelado) e transferidas das cavidades da placa para os respectivos tubos cônicos. Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 3 minutos, o sobrenadante descartado, e a seguir, as células ressuspensas em *Stain Buffer BSA* (gelado). Adicionou-se às suspensões celulares 100µL de *Fcblock* diluídos em tampão *Cell Staining Buffer*, e procedeu-se incubação de 20 minutos a 4°C. Terminada esta incubação, as células foram lavadas com *Stain Buffer BSA*, sendo os tubos

centrifugados a 1800 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, iniciou-se a marcação das moléculas de superfície CD3, CD4 e CD8, visto que a produção de citocinas foi analisada nestas subpopulações de linfócitos. Para isto, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados: anti-CD3 (FITC), anti-CD4 (PE-Cy7) e anti-CD8 (PercP) diluídos em tampão de *Cell Staining Buffer*, seguindo incubação de 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 500µL de tampão *Stain Buffer BSA*, sendo os tubos centrifugados novamente a 1800 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 250µL de solução *CytoFix/CitoPerm* (BD Bioscences Pharmingen), a fim de proporcionar a fixação e permeabilização das células. Após incubação de 20 minutos a 4℃, e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com tampão *Perm Wash* (BD Biosciences Pharmingen). O sobrenadante foi aspirado, e as células ressuspendidas em tampão *Perm Wash*, contendo os anticorpos monoclonais citocina/quimiocina-específicos, todos conjugados com PE (diluição 1:100).

Seguiu-se nova incubação a 4℃, e ao abrigo da luz, por um período de 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com tampão *Perm Wash* e centrifugadas a 1800 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi aspirado, o *pellet* ressuspendido e a todos os tubos foram adicionados 150µL de formaldeído 1% em PBS (1x).

Após a transferência do volume para tubos apropriados, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo BD FACS-Canto (BD Biosciences). A análise dos resultados foi executada usando o programa FACSDiva (BD). Todos os anticorpos monoclonais foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen.



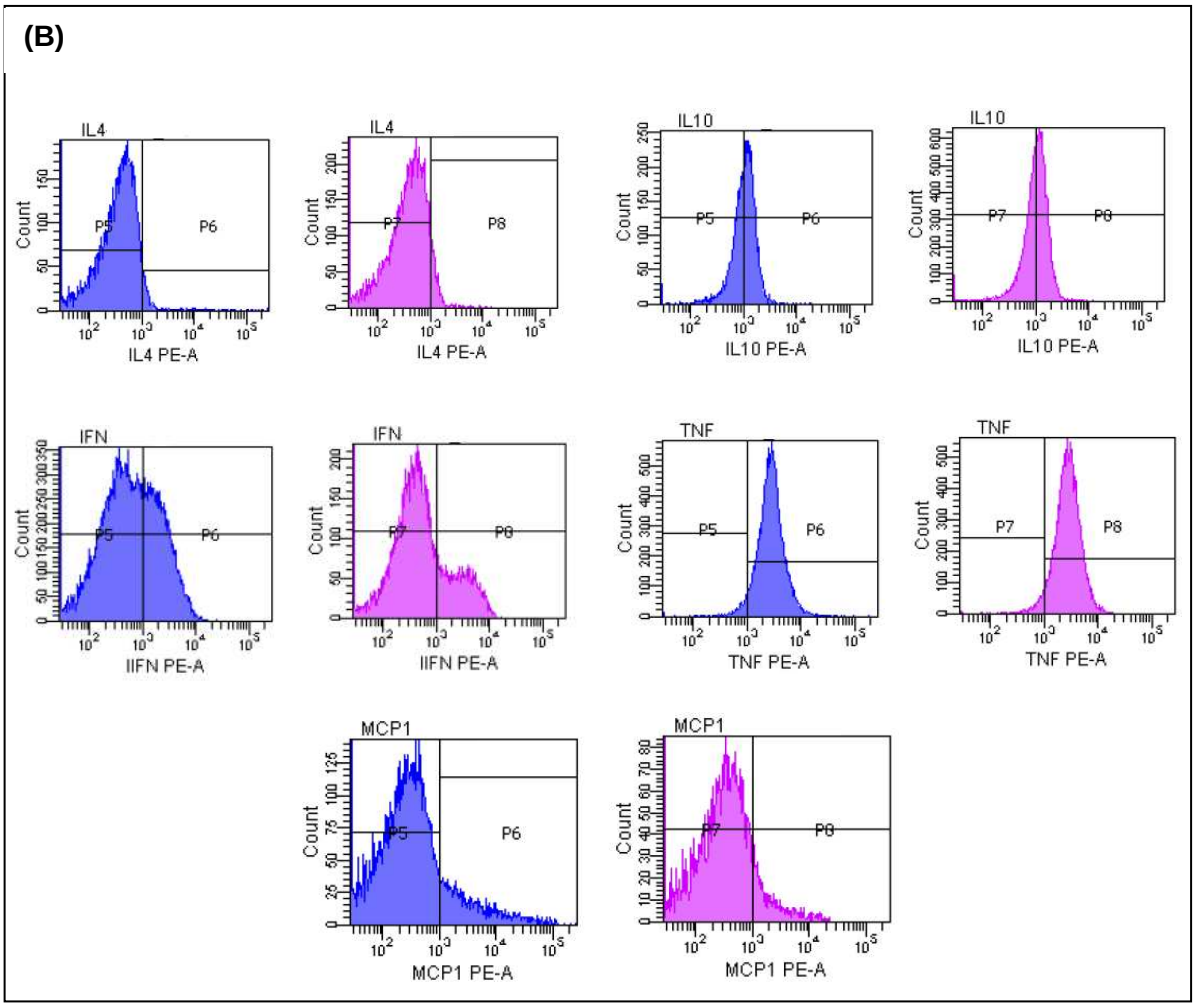


Figura 10 - Em **(A),** estratégia de aquisição da população linfocitária de acordo com as características de tamanho, granulosidade e expressão de CD3; gráfico em *dot plot* representativo das subpopulações de linfócitos $CD3^{+}CD4^{+}$ e $CD3^{+}CD8^{+}$. Em **(B)**, histogramas representativos das subpopulações de linfócitos, subdivididas em relação à expressão de IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e MCP-1.

4.12 Análise da proliferação de timócitos através de ensaio com MTT

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem o MTT *(3-(4-5 dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)*, um sal de coloração amarela e solúvel em água, a formazan (cristais de coloração arroxeada e insolúvel em água), pela ação de enzimas. A redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e viabilidade celular.

As células do timo foram maceradas e centrifugadas a 1800 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em RPMI-1640 contendo 10% de SBF. Uma alíquota de 100µL desta suspensão, contendo $2x10^6$ células, foi distribuída em placa de 96 poços, sendo adicionados 100µL concanavalina A (ConA: 4 mg/mL) nos poços estimulados. A placa foi levada à estufa contendo 5% de CO_2, durante 48 horas a 37ºC. Ao final deste período de incubação, a placa foi retirada e adicionados 50µL de MTT a cada poço (5 mg/mL diluídos em RPMI incolor). Após 4 horas, adicionou-se 50µL de isopropanol aos poços, sendo a placa mantida em temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, a absorbância (A) foi determinada utilizando leitor de microplacas, filtro de 570nm.

4.13 Análise da proliferação de esplenócitos através de ensaio com CFSE

Para realização dos ensaios de proliferação celular, os esplenócitos isolados, na concentração de $2x10^6$ células, foram ressuspensos em PBS (1x) pré-aquecido (37℃) e incubados com 5µM de CFSE (Molecu lar Probes, Invitrogen), durante 10 minutos no escuro a 37℃. Em seguida, a marcação foi interrompida pela adição de meio RPMI suplementado com 5% de SBF (gelado). Após 1 minuto, os tubos contendo as suspensões celulares foram submetidos à centrifugação a 1800 rpm por 6 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em meio RPMI, contendo 5% de SBF. Alíquotas desta suspensão celular foram então distribuídas em placas de 96 poços, com fundo redondo, e incubadas, ao abrigo da luz, na presença de antígenos de *T.cruzi*, em estufa de CO_2 (5%), durante 5 dias a 37ºC.

Após o término da incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 1800 rpm por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS (1x). Adicionou-se às suspensões celulares, 100µL de *Fcblock* diluídos em tampão *Cell Staining Buffer*, e procedeu-se incubação de 20 minutos a 4°C. Terminada esta incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) e a placa centrifugada a 1800 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, iniciou-se a marcação das moléculas de superfície CD3: as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados anti-CD3 (APC), diluídos em tampão de *Cell Staining Buffer* (diluição 1:100µL), seguindo incubação de 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se PBS (1x), sendo realizada outra centrifugação a 1800 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão *Cell Staining*

Buffer e transferidas para os tubos de leitura. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS-Canto (BD Biosciences) e as análises dos resultados executadas utilizando-se o programa FACSDiva (BD). A avaliação da proliferação antígeno-específica de linfócitos T ($CD3^+$) é baseada na diluição do fluorocromo CFSE (células $CD3^+CFSE^{low}$), onde a população com menor fluorescência é selecionada. Durante a divisão celular, O CFSE sofre ação de estereases e emite uma fluorescência detectada pelo citômetro no canal FITC. As células marcadas com este fluorocromo ao se dividirem distribuem esse marcador para as células filhas, ou seja, células que passaram por vários ciclos de divisão celular perdem sua fluorescência progressivamente, fato que pode ser observado por citometria de fluxo (RIBEIRO, 2010).

4.14 Análise estatística

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software USA). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância: One Way ANOVA e post-test Bonferroni e também através do teste não paramétrico Mann-Whitney. Considerando estatisticamente significante $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Parasitemia

A contagem de parasitas sanguíneos foi realizada no 7º e 14º dias após a infecção. O pico parasitêmico ocorreu no 7º dia, sofrendo queda no 14º dia após o inóculo. Durante o pico da parasitemia, o grupo tratado com prolactina (IP) demonstrou maior resistência à infecção, apresentando diminuição significativa no número de parasitas quando comparado ao grupo sem tratamento (I). Já no 14° dia, não houve diferença significativa entre a parasitemia do grupo tratado e do grupo não tratado.

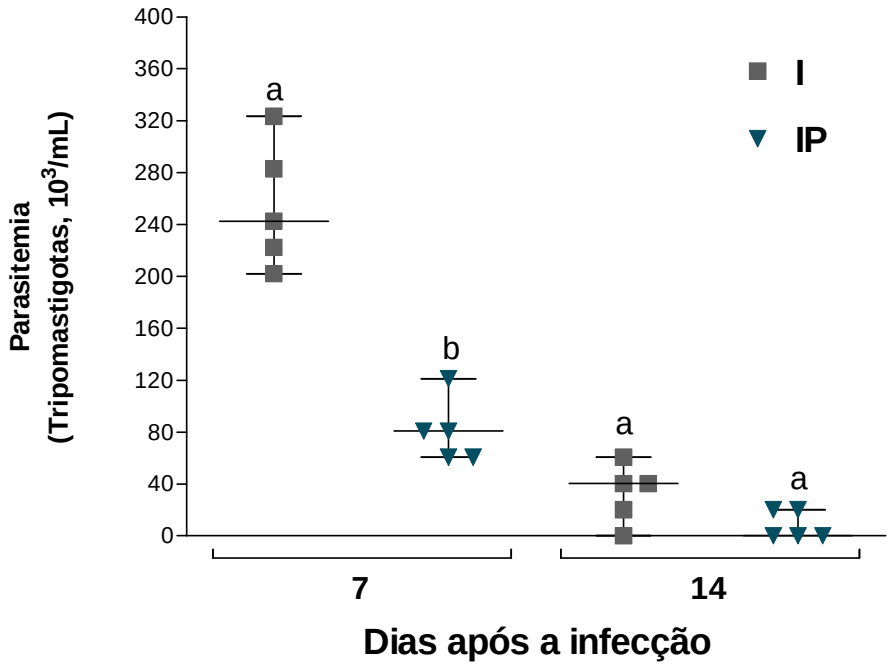


Figura 11 - Evolução da parasitemia em ratos Wistar infectados com 100.000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T.cruzi*, durante os 7º e 14º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para todos os grupos de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em Mediana, valores mínimo e máximo. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

5.2 Análise do percentual de macrófagos peritoneais e expressão de RT1B

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

Nos 7º e 14º dias após a infecção, os grupos infectados (I e IP) apresentaram aumento significativo no percentual de macrófagos, quando comparados aos grupos controles, sem infecção (C e CP). Além disso, no 7º dia após a infecção, o percentual de macrófagos no grupo infectado submetido ao tratamento com PRL foi significativamente maior, quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.

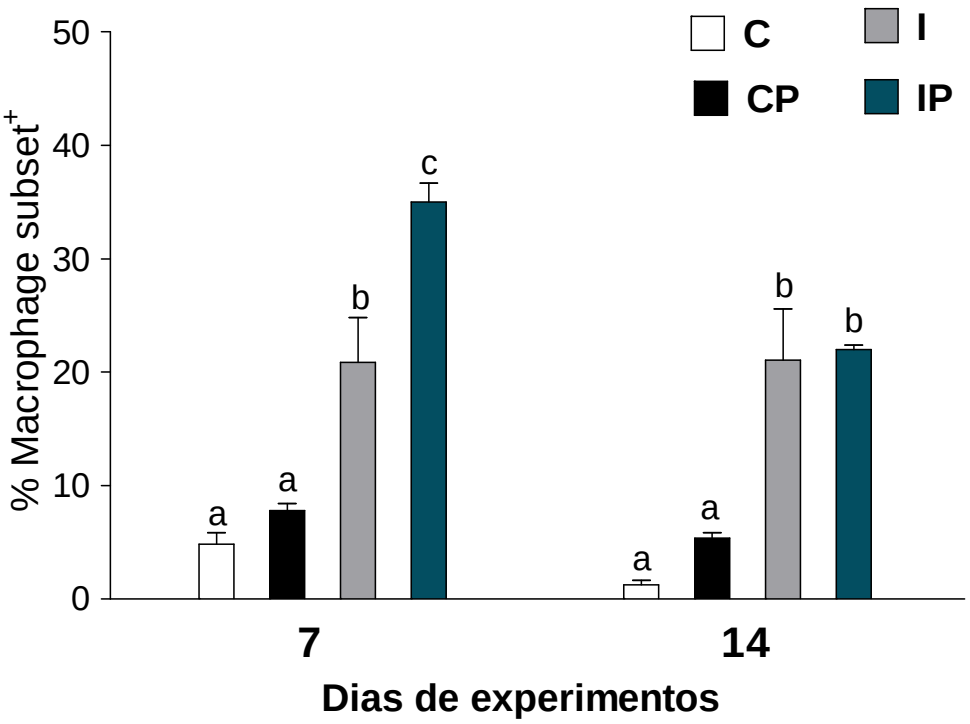


Figura 12 - Representação gráfica dos níveis de expressão do antígeno de superfície celular ED2-like (marcador de macrófagos teciduais) em células obtidas a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Com relação à expressão da molécula RT1B em macrófagos, não foram observadas alterações significativas entre os grupos de animais tratados e não tratados com prolactina. Este perfil foi observado tanto nos animais infectados, como nos animais não infectados. No 14° dia após a infecção os animais infectados (I e IP) apresentaram um aumento significativo na expressão de RT1B em macrófagos quando comparados aos animais dos grupos controles, não infectados (C e CP).

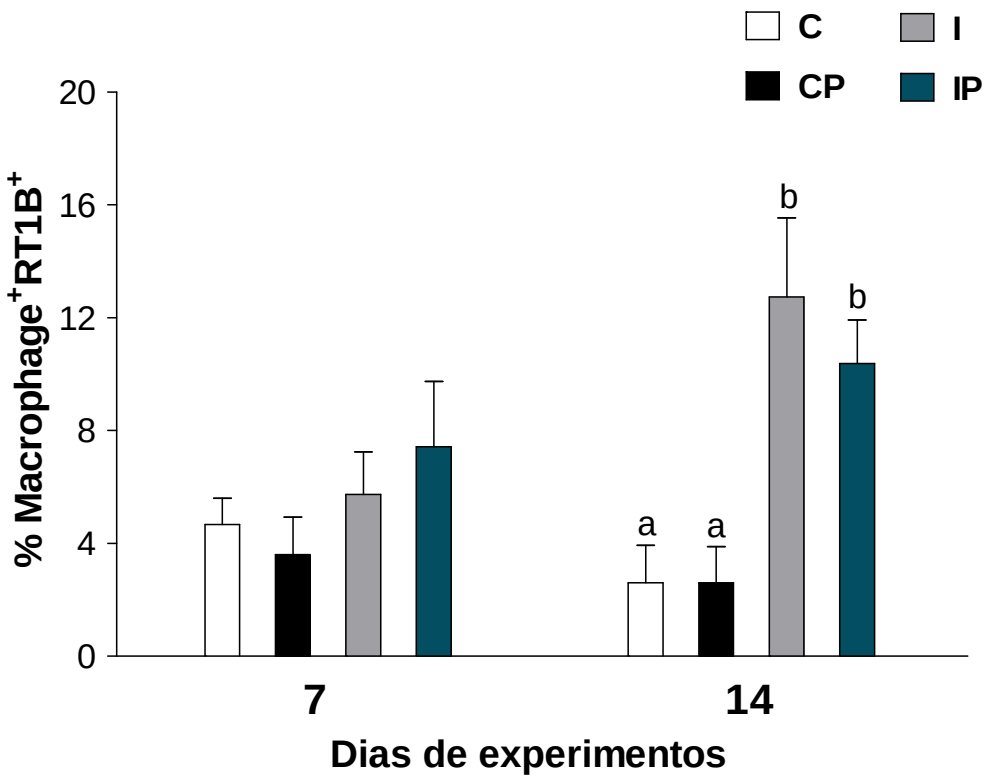


Figura 13 - Representação gráfica dos níveis de expressão do antígeno RT1B (MHC classe II, I-A equivalent) em macrófagos obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguinte s grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.3 Quantificação de Óxido Nítrico produzido por células obtidas a partir do lavado da cavidade peritoneal

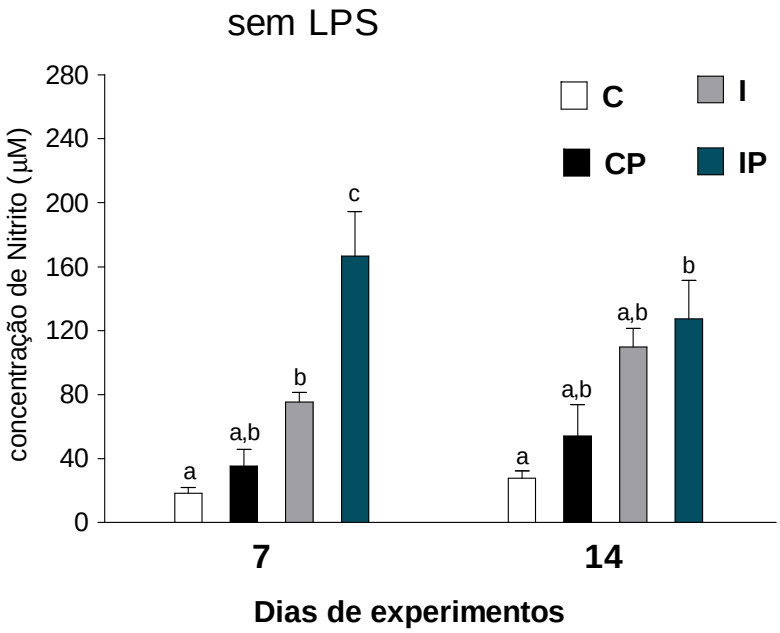
Culturas de células não estimuladas com LPS:

No 7º dia após o inóculo, o grupo infectado e tratado com prolactina (IP) apresentou concentrações de nitrito estatisticamente mais elevadas, quando comparado aos animais dos demais grupos, incluindo o infectado e não tratado com prolactina.

Culturas de células estimuladas com LPS:

Durante o 7º dia de experimento, o grupo infectado e também submetido ao tratamento com prolactina (IP) apresentou um aumento significante na produção de nitrito, quando comparado ao grupo infectado e não submetido ao tratamento (I).

Já no 14° dia de experimento, os níveis de nitrito foram maiores nos animais infectados em relação aos grupos controles, no entanto nenhuma alteração significativa foi observada entre o grupo infectado tratado com PRL e o grupo infectado e não tratado.



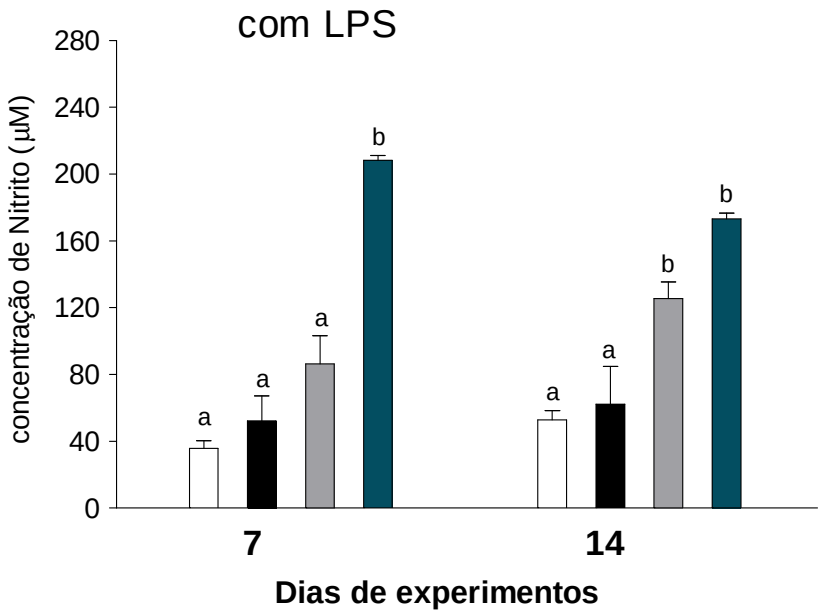


Figura 14 - Concentrações de Nitrito (µM) em culturas de células peritoneais estimuladas ou não com LPS (10µg/mL), coletadas de ratos Wistar durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.4 Análise do percentual de células apresentadoras de antígenos (CD11 b/c$^+$) e expressão de CD80 e CD86

Nas células obtidas a partir do baço dos animais, durante o 14º dia de experimento, o grupo infectado e tratado com prolactina (IP) apresentou um percentual de células apresentadoras de antígenos (APCs) maior, quando comparado aos grupos controles não infectados (C e CP). Porém, não foram observadas alterações significativas no percentual de APCs, entre o grupo infectado e tratado (IP) e o grupo infectado e não tratado (I).

Já nas amostras de células obtidas a partir do lavado peritoneal, os resultados obtidos demonstraram que, no 14º dia de experimento, os animais submetidos à terapia com prolactina (IP) apresentaram um aumento significativo na porcentagem de APCs, quando comparados aos animais infectados e não tratados (I). Entre os animais dos grupos controles, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Em relação à análise da expressão de moléculas coestimulatórias em APCs coletadas do lavado peritoneal, os resultados obtidos demonstraram que, no 14º dia de experimento, houve um aumento significativo na expressão de CD80 e CD86 nas células dos animais infectados e submetidos ao tratamento com prolactina (IP), quando comparado aos animais dos demais grupos, inclusive o grupo infectado e não tratado.

Nas células do baço, não houve diferenças relevantes na expressão de moléculas coestimulatórias. O tratamento com prolactina não alterou os percentuais de CD80 e CD86 nos animais infectados, quando comparados com o grupo infectado e não tratado.

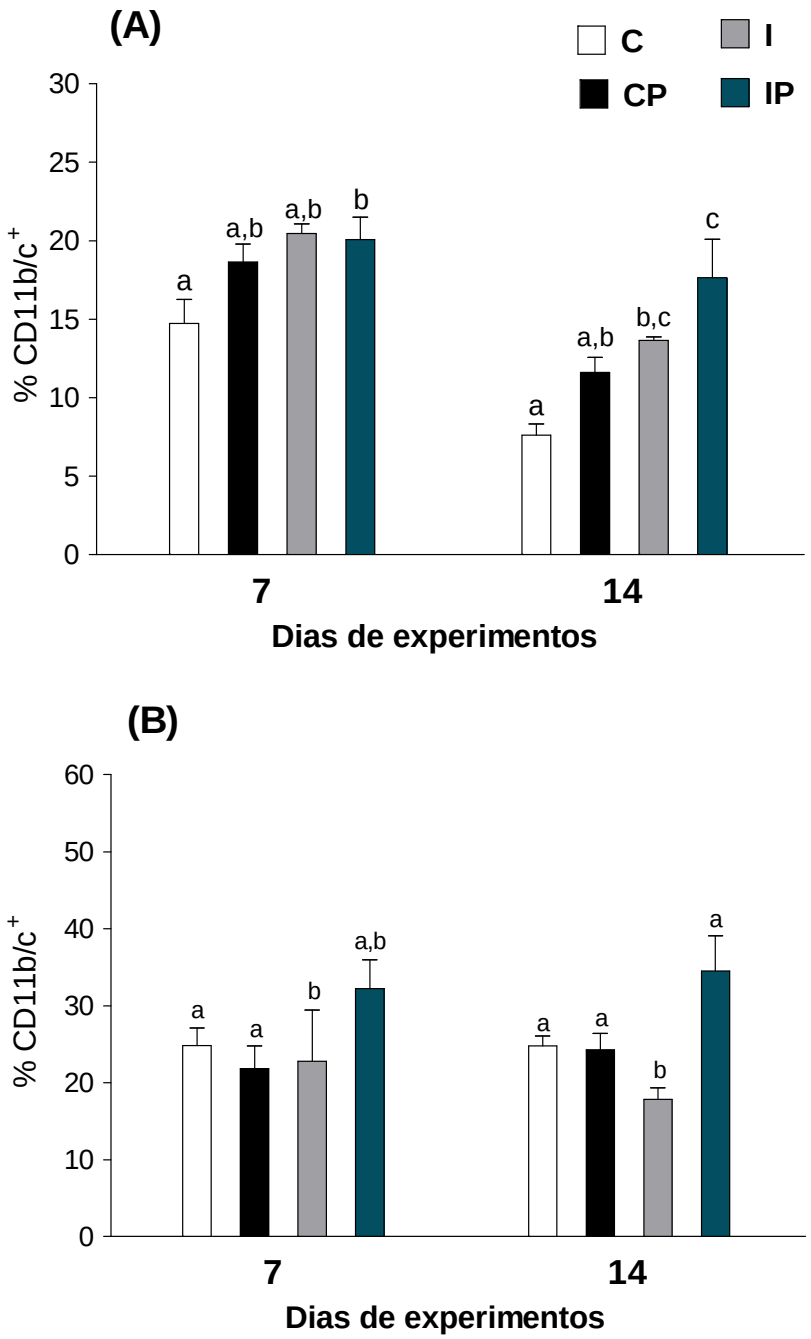


Figura 15 - Representação gráfica dos níveis de expressão do marcador CD11b/c em células do baço **(A)** e do lavado peritoneal **(B)** de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.
Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

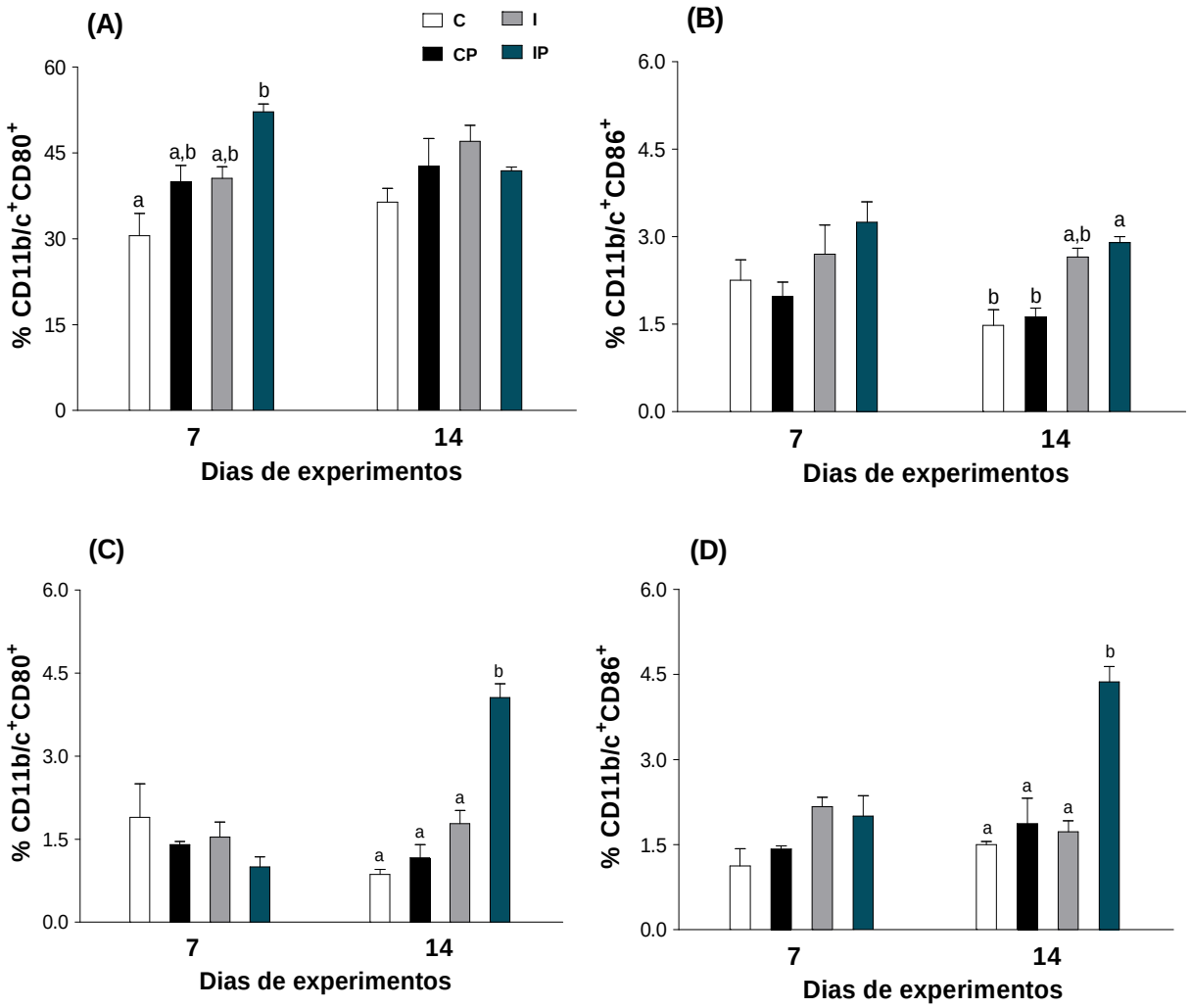


Figura 16 - Representação gráfica dos níveis de expressão das moléculas CD80 e CD86 em células CD11b/c$^+$ do baço **(A, B)** e do lavado peritoneal **(C, D)** de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.5 Análise do percentual de células NK ($CD161^+$) e NKT ($CD3^+CD161^+$)

Durante o 14º após a infecção, a administração de prolactina resultou em elevação no percentual de células NK, nos animais infectados e tratados (IP). Entre os animais controles, sem infecção (C e CP), nenhuma diferença significativa foi verificada.

De acordo com os resultados apresentados, no 7° dia de experimento, o grupo infectado submetido ao tratamento com PRL (IP) apresentou um elevado percentual de células NKT em relação aos grupos controles (C e CP). Além disso, houve diferença estatisticamente relevante entre os percentuais de células NKT do grupo infectado e tratado (IP) e o grupo infectado não suplementado com prolactina (I).

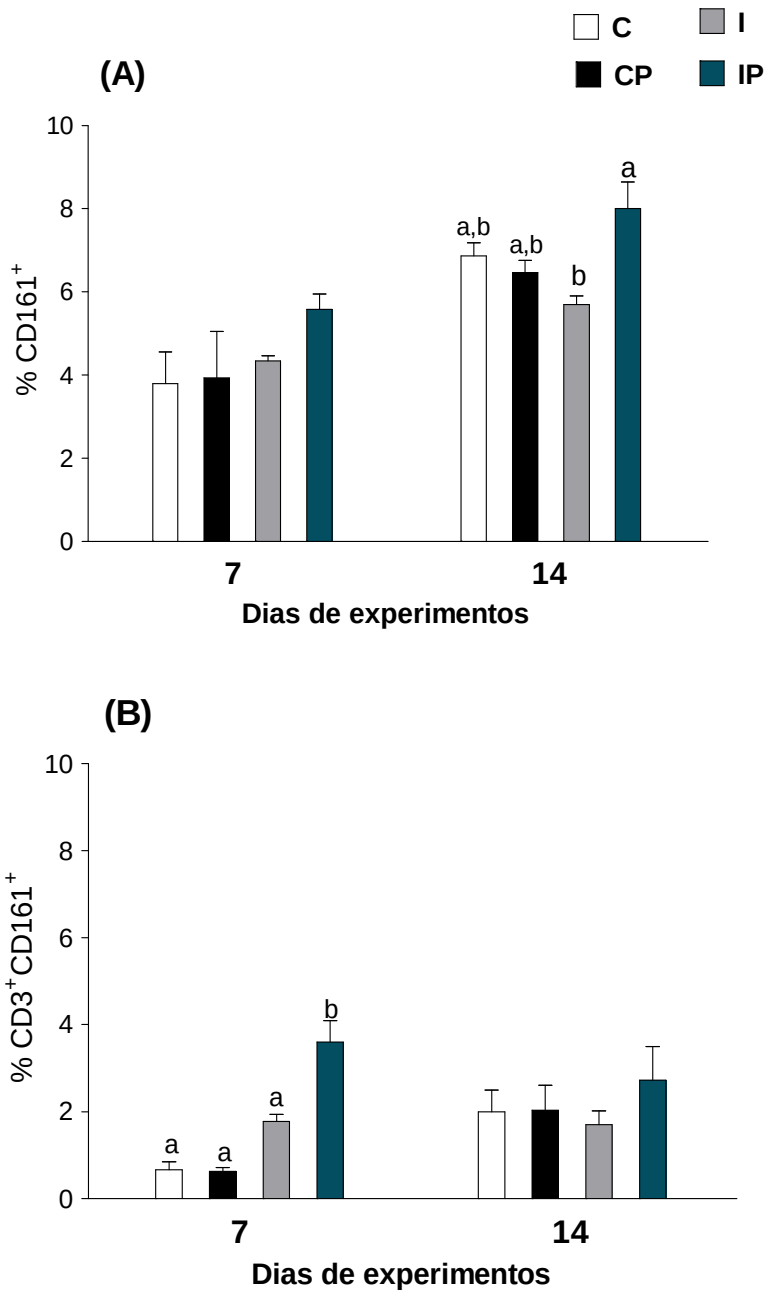


Figura 17 - Análise do percentual de células NK **(A)** e NKT **(B)**, obtidas a partir do baço de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.6 Análise do percentual de Linfócitos B (CD45RA$^+$)

As porcentagens de linfócitos B foram determinadas através da marcação realizada em citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais para a molécula CD45RA. Conforme observado na figura a seguir, o grupo infectado tratado com PRL (IP) apresentou um aumento considerável na expressão de CD45RA, quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (I), durante o 14º dia após a infecção.

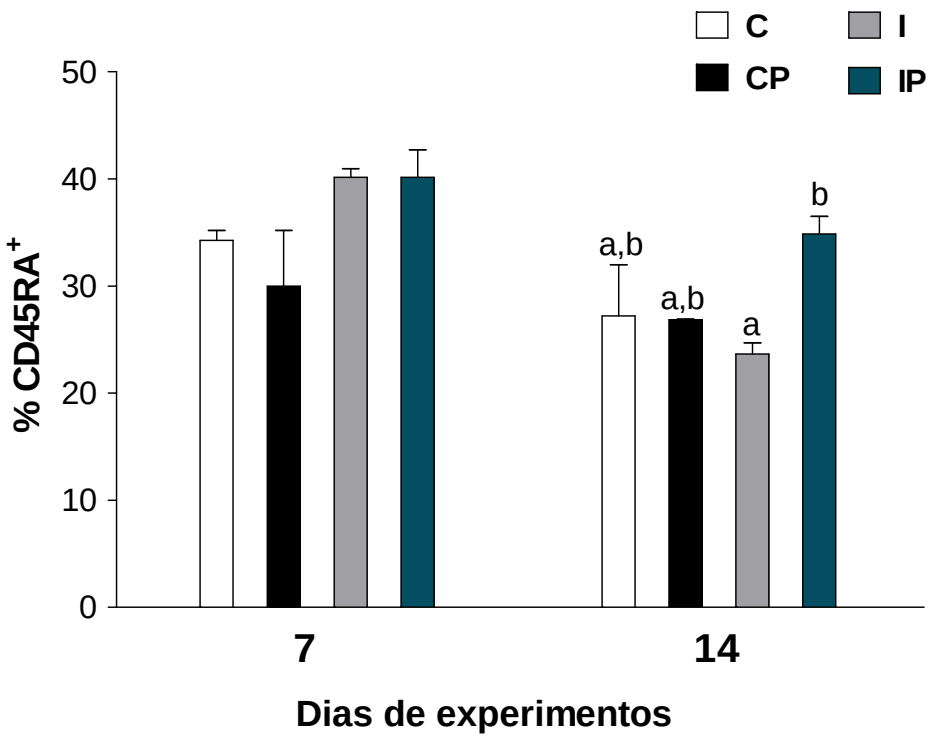


Figura 18 - Representação gráfica dos níveis de expressão da molécula CD45RA (marcador de linfócito B) em células obtidas a partir do baço de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.
Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.7 Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$

Após a análise dos resultados, observou-se que, durante o 14º dia de experimento, o grupo infectado submetido ao tratamento com prolactina (IP) apresentou um percentual de linfócitos T $CD4^+$ estatisticamente maior, em relação aos percentuais apresentados pelos demais grupos, incluindo o infectado e não tratado.

Já os percentuais de células $TCD8^+$ foram significativamente maiores nos grupos infectados (I e IP), quando comparados aos percentuais dos grupos controles, sem infecção (C e CP), durante o 14º dia de experimento. No entanto, a administração de prolactina nos animais infectados não causou nenhuma alteração significativa no percentual de células T $CD8^+$, quando comparados aos animais infectados e não tratados.

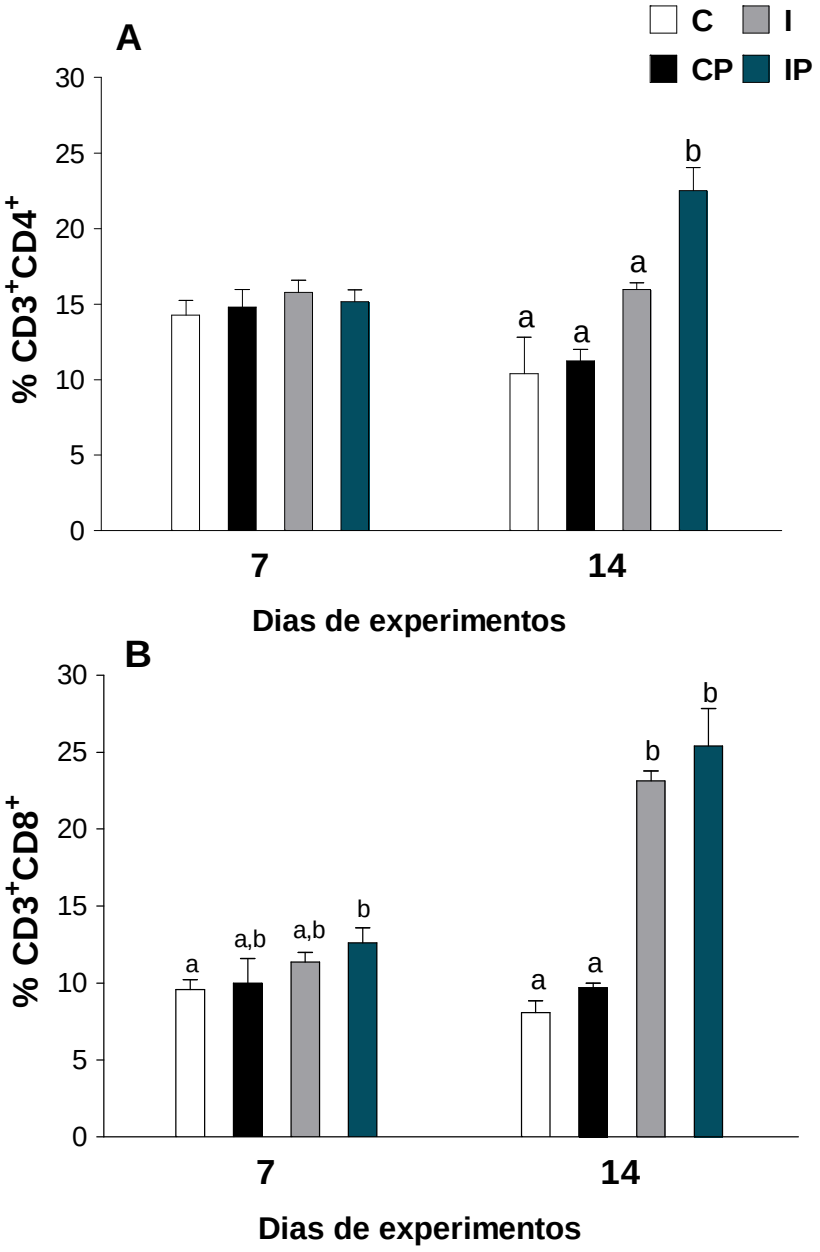


Figura 19 - Análise das subpopulações de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ **(A)** e T $CD3^+CD8^+$ **(B)** no baço de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.8 Análise da expressão de moléculas CD11a e CD28 nas subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$

Como pode ser observado nas figuras a seguir, no 14º dia de experimento, a infecção por si provocou um aumento na expressão da molécula CD11a, tanto em linfócitos T $CD4^+$, como em linfócitos T $CD8^+$, quando comparados aos grupos controles sem infecção, demonstrando potencial capacidade migratória destas células durante a fase aguda da doença.

Já no grupo infectado e suplementado com prolactina (IP), não foram observadas diferenças relevantes na expressão de CD11a nos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, quando comparado aos animais infectados não submetidos ao tratamento (I).

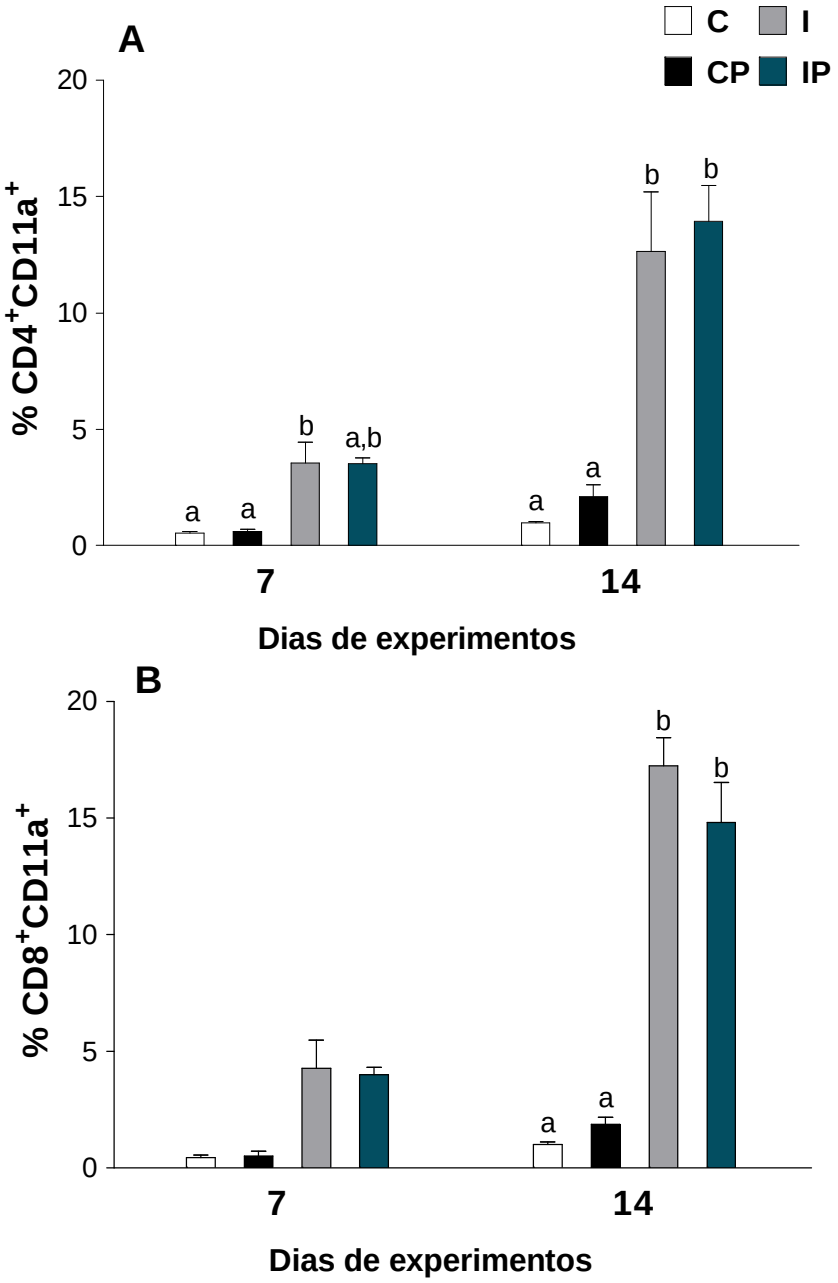


Figura 20 - Avaliação do percentual de linfócitos $TCD4^{+}CD11a^{+}$ **(A)** e $TCD8^{+}CD11a^{+}$ **(B)** em células esplênicas de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Além da molécula CD11a, a expressão de CD28, outro marcador característico de ativação celular, também foi avaliada. E assim como ocorreu com o CD11a, os percentuais de linfócitos T $CD4^{+}CD28^{+}$ e T $CD8^{+}CD28^{+}$, foram maiores nos grupos infectados (I e IP), quando comparados ao grupos controles (C e CP).

A análise comparativa entre os grupos infectados tratados e não tratados demonstrou que a administração de prolactina nos animais não causou nenhuma alteração significativa na expressão da molécula CD28.

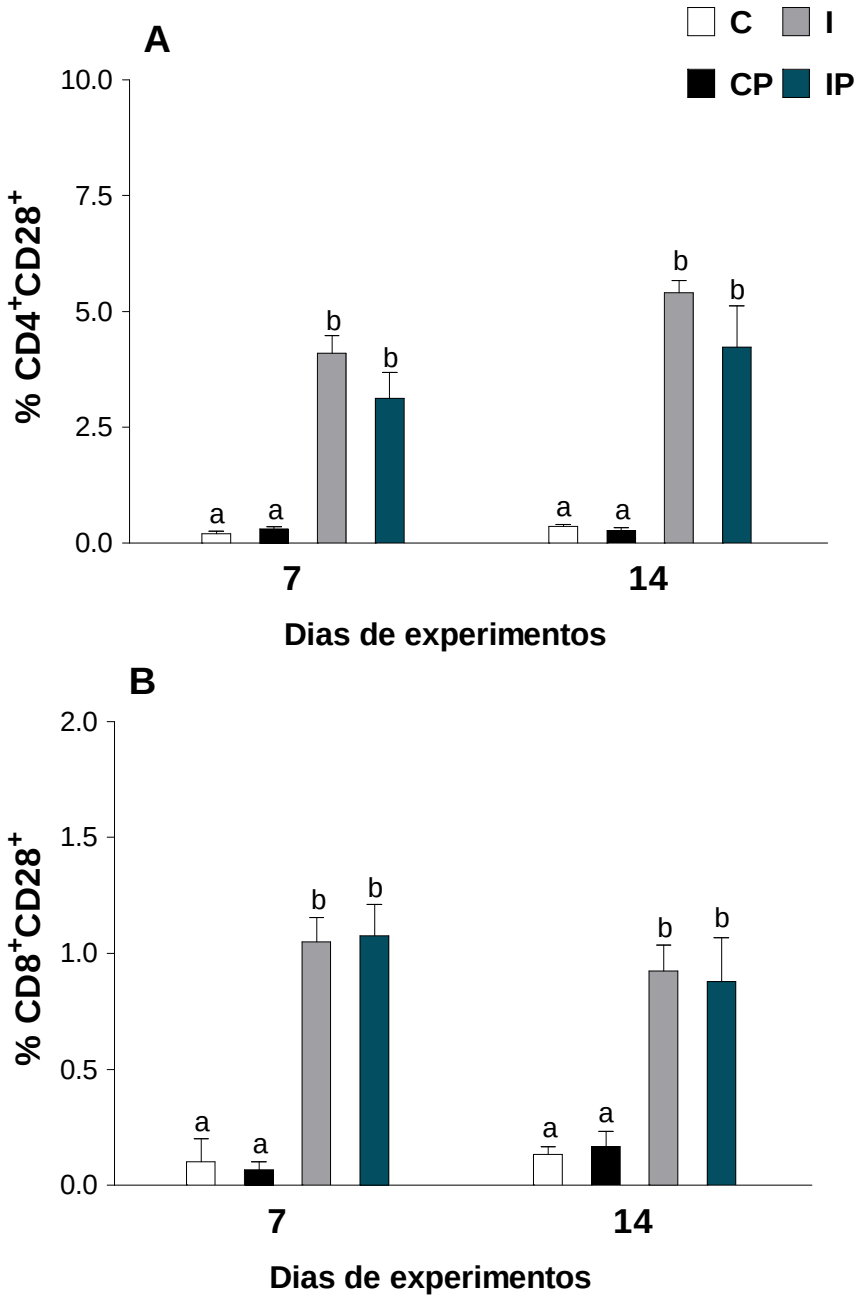


Figura 21 - Avaliação do percentual de linfócitos $TCD4^{+}CD28^{+}$ **(A)** e $TCD8^{+}CD28^{+}$ **(B)** em células esplênicas de ratos Wistar, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.9 Linfoproliferação de timócitos

Sem Con-A:

Nos grupos controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas. No grupo infectado e tratado com prolactina (IP), o nível de proliferação de timócitos foi estatisticamente mais elevado do que no grupo infectado não suplementado com PRL (I), durante os todos os dias de experimento.

Com Con-A:

Os grupos controles (sem infecção), não apresentaram diferenças significativas na resposta proliferativa.

No 14º dia de experimento, as células estimuladas do grupo infectado e submetido ao tratamento com prolactina (IP) apresentaram maior índice de proliferação quando comparadas às células do grupo infectado não submetido ao tratamento (I).

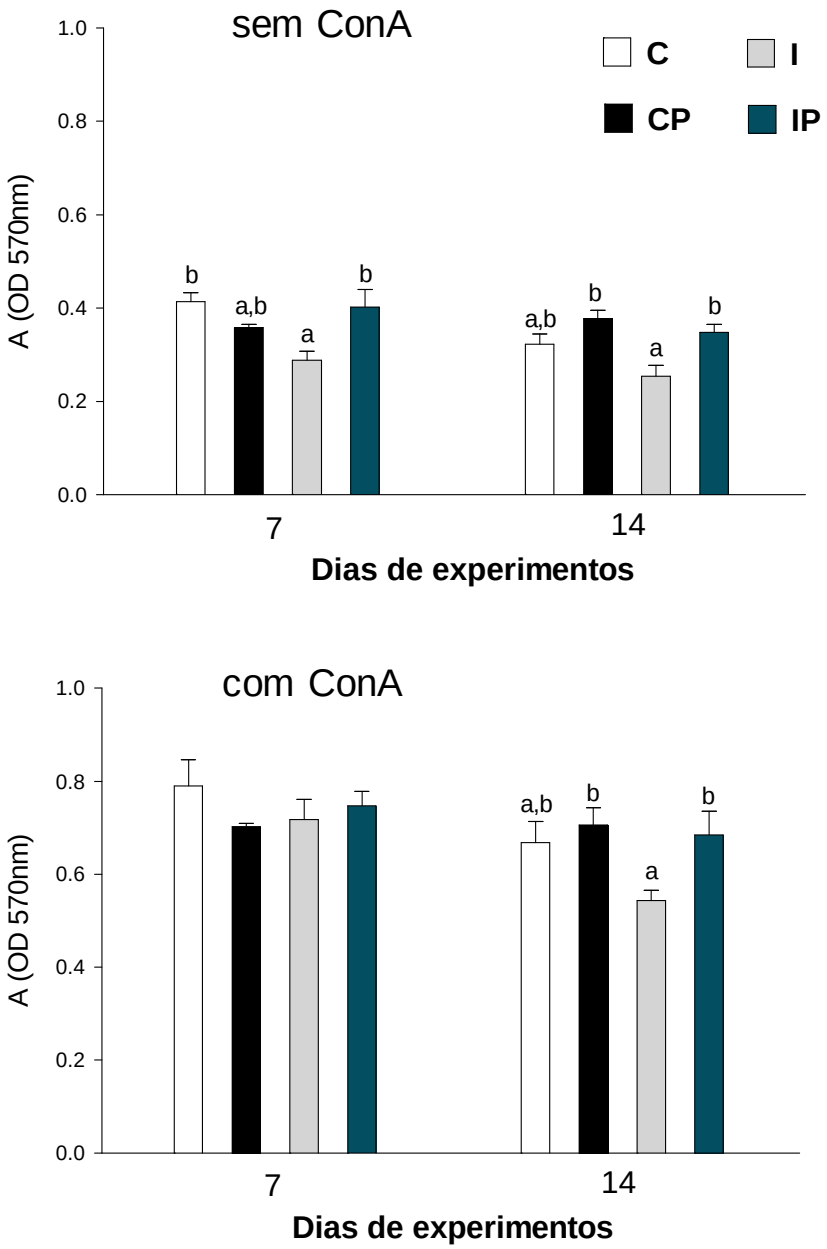


Figura 22 - Proliferação de timócitos coletados de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com 40µg de Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com 40µg de Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.10 Avaliação da proliferação celular utilizando ensaio de CFSE

Para a análise da proliferação celular, os esplenócitos foram previamente marcados com CFSE, uma molécula capaz de associar-se a proteínas do citoplasma celular e ser distribuída às células filhas de forma similar, o que possibilita a detecção do aumento da proliferação, em função da queda da fluorescência nestas células.

No 7° dia de experimento, foi possível observar um percentual significativamente maior de linfócitos proliferando ($CFSE^{low}$) nos animais do grupo infectado e tratado com prolactina (IP), quando comparados ao grupo infectado sem tratamento (I).

Os grupos controles (sem infecção), não apresentaram diferenças significativas na resposta proliferativa de linfócitos.

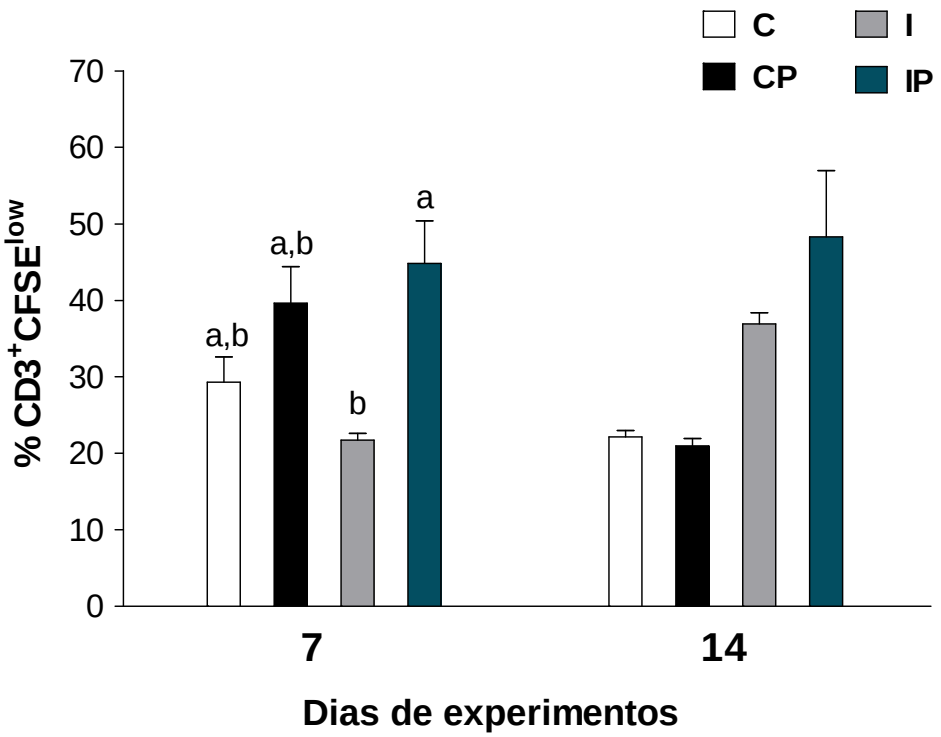


Figura 23 - Proliferação de esplenócitos coletados de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado Prolactina (IP). As células foram marcadas com CFSE e colocadas em cultura por 5 dias em contato com antígenos de *T.cruzi*. Após este período, os esplenócitos foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3 conjugados a fluorocromos (APC) e a proliferação determinada em citômetro de fluxo, através da queda na fluorescência do CFSE. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.11 Análise do processo de apoptose

Foram avaliados através da citometria de fluxo, os percentuais de células esplênicas, positivas apenas para anexina-V (estágio recente do processo de apoptose) e positivas tanto para anexina-V e como para PI (estágio tardio de apoptose), em animais infectados por *T. cruzi* e animais do grupo controle, submetidos ou não ao tratamento com prolactina.

Nos 7º e 14º dias de experimentos, a análise dos dados demonstrou que em animais infectados, a administração de prolactina resultou em redução no percentual de células em apoptose inicial e também tardia, em relação ao grupo de animais infectados, sem tratamento (I).

Através da utilização dos marcadores anexina-V e PI, foi possível identificar também, o percentual de células viáveis, ou seja, anexina-V e PI negativas. Durante os 7º e 14º dias após a infecção, os animais infectados e tratados com prolactina (IP) apresentaram elevados percentuais de células viáveis, quando comparados aos animais infectados e não tratados (I).

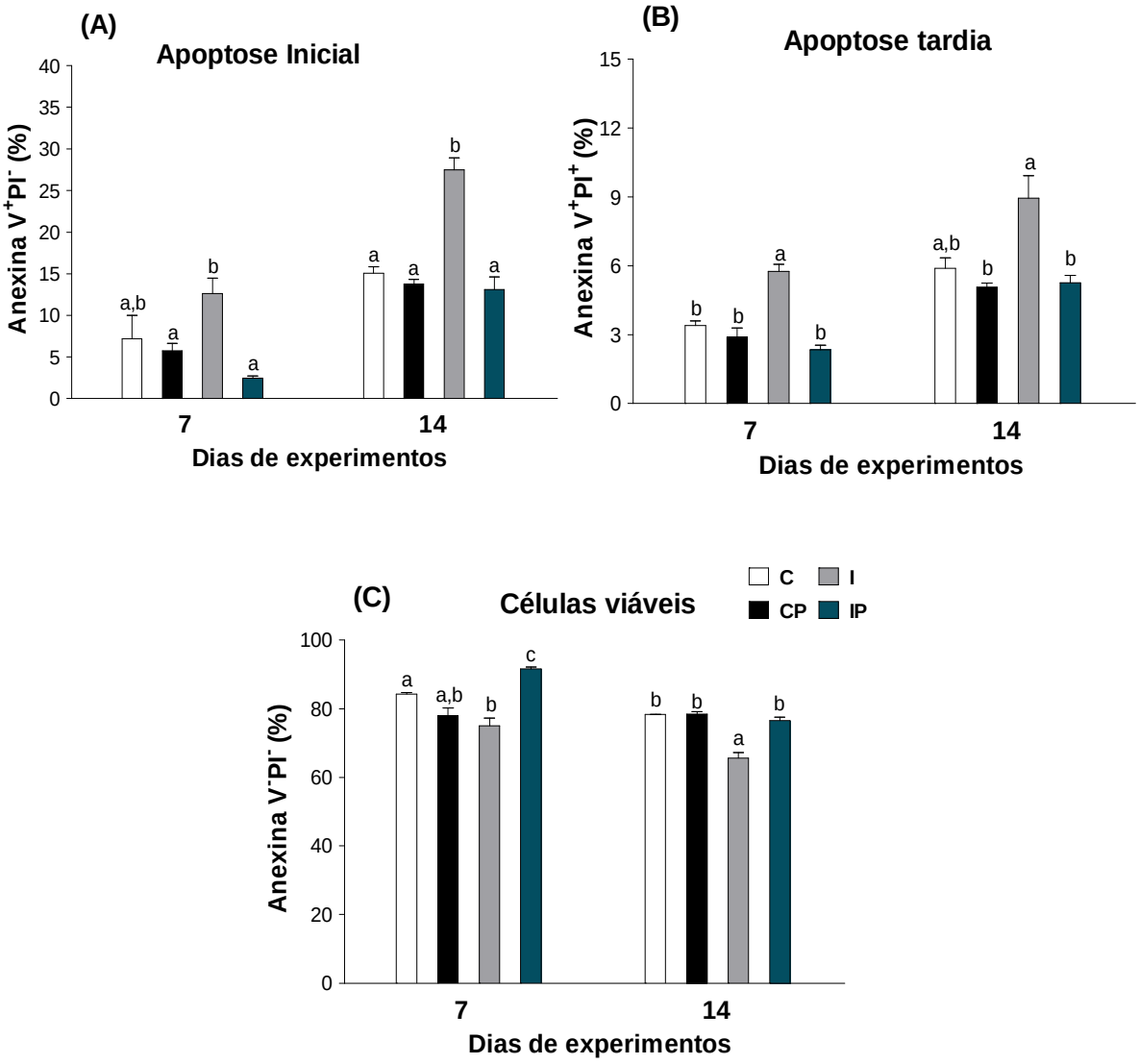


Figura 24 - Marcação de células esplênicas de ratos Wistar, utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, durante 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). As células foram marcadas com anexina-V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose **(A)** e também com anexina-V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose **(B)**. Em **(C)**, células viáveis.

Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5; resultados apresentados em média e erro padrão da média.

Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

Adicionalmente, foi realizada a avaliação do perfil apoptótico dos esplenócitos, após incubação em estufa, a 37ºC (5% de CO_2), por 4 horas, utilizando como estímulo antígenos de *T. cruzi*.

Sem estímulo: No 7º de experimento, as células esplênicas dos animais não infectados e tratados com prolactina (CP) apresentaram redução no percentual de células em apoptose inicial, em relação às células dos animais do grupo controle sem infecção e sem tratamento (C). Entre os animais infectados, o grupo tratado (IP) apresentou redução significativa nos percentuais de apoptose inicial e tardia, quando comparados aos animais infectados e não tratados (I).

Com extrato parasitário: No 7º dia de experimento, o grupo de animais infectados e tratados com prolactina (IP), apresentou um percentual de apoptose inicial menor, quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. Na avaliação das células esplênicas em estágio tardio de apoptose, nenhuma alteração significativa foi observada.

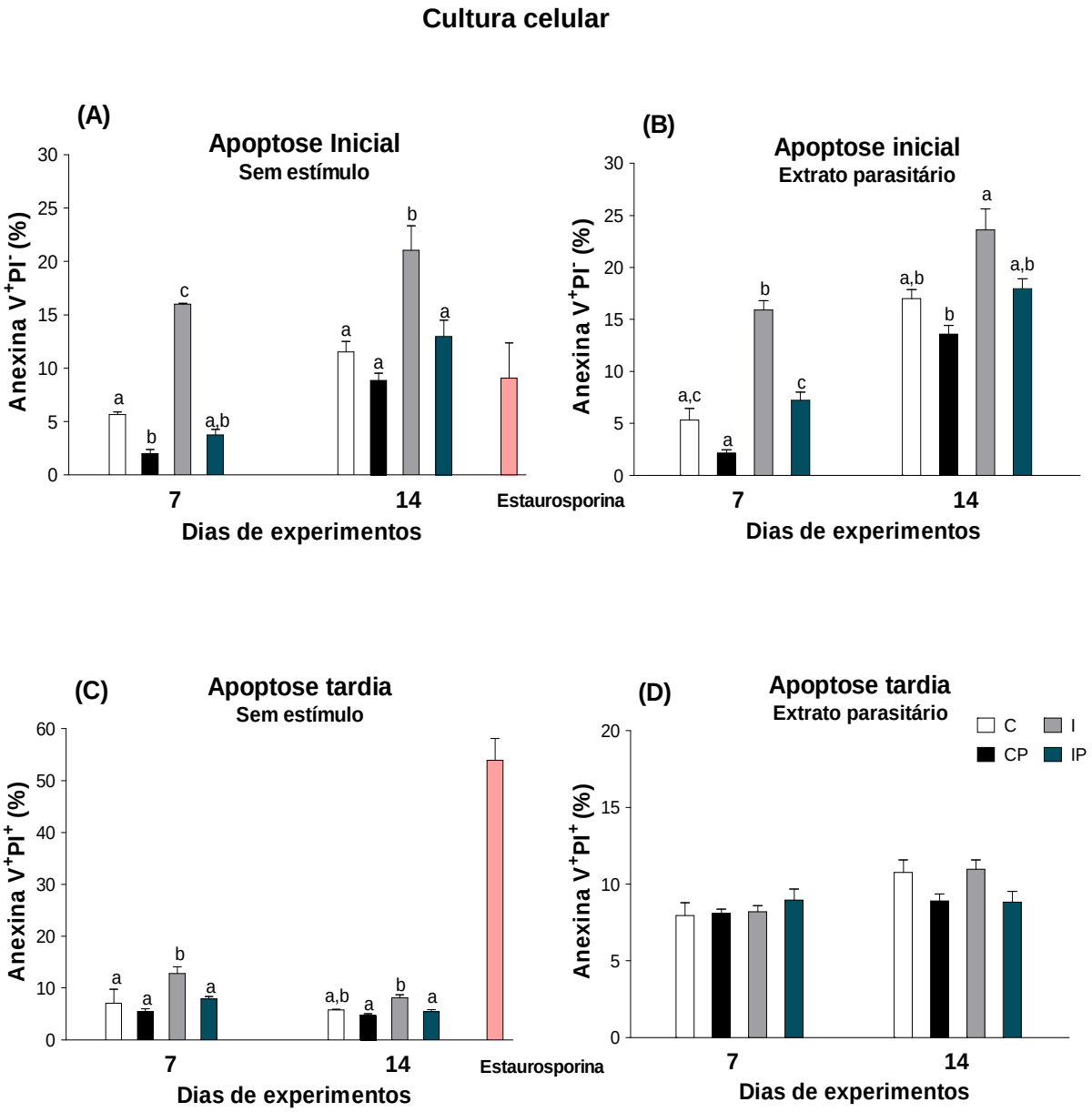
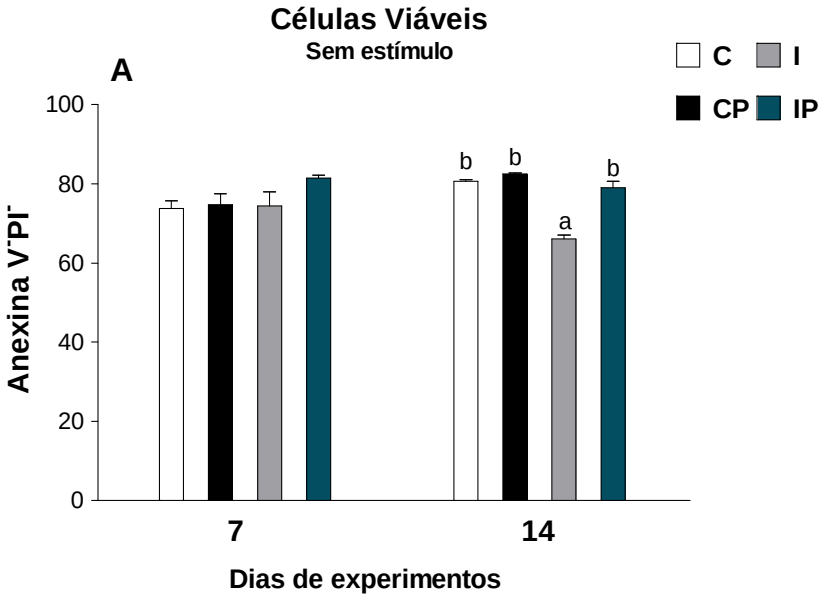


Figura 25 - Marcação de células esplênicas, estimuladas ou não com extrato parasitário (25µg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP), Estaurosporina (controle positivo).

As células foram marcadas com anexina V-FITC para caracterização do estágio recente de apoptose **(A e B)** e também com anexina V-FITC associada ao iodeto de propídeo para caracterização do estágio tardio de apoptose **(C e D)**. Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

De acordo com a figura a seguir, no 14º dia de experimento, as células esplênicas não estimuladas, provenientes de animais infectados e tratados (IP), apresentaram um aumento no percentual de células viáveis, quando comparados aos animais do grupo infectado e não tratado com prolactina (I). Em relação às células estimuladas com extrato parasitário, nenhuma alteração significativa foi observada entre o grupo infectado tratado e o infectado não tratado.



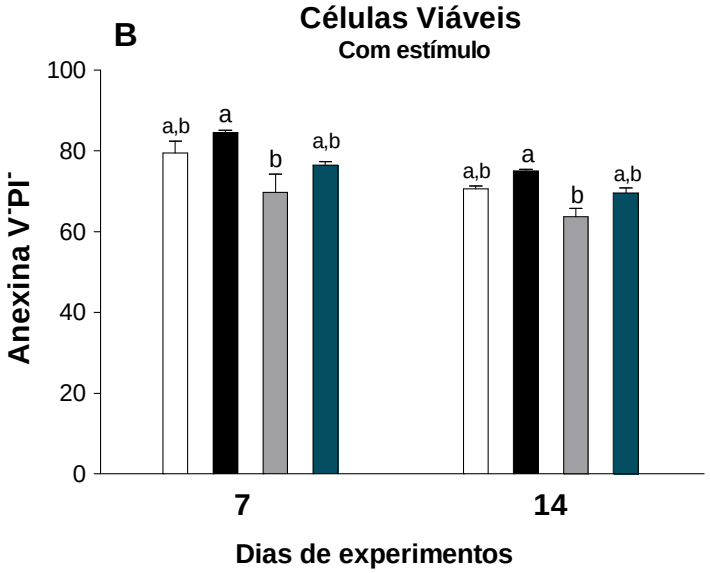


Figura 26 - Marcação de células esplênicas, não estimuladas **(A)** ou estimuladas **(B)** com extrato parasitário (25µg/mL), utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Con trole (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Gráficos A e B: análise do percentual de células viáveis (anexina V FITC$^-$PI$^-$). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

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

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

Tanto no 7°, como no 14° dia de experimento, não fo ram observadas alterações significativas nos percentuais de células T $CD4^+IL\text{-}4^+$ entre os diferentes grupos.

No 7° de experimento, a análise das células T $CD4^+$ produtoras de IL-10 revelou que os animais do grupo controle tratado com prolactina (CP), apresentaram uma redução na produção de IL-4, quando comparados aos animais não infectados e sem tratamento (C). Porém, nenhuma alteração foi observada entre os grupos: infectado tratado (IP) e infectado não tratado (I).

No 14º dia após a infecção, foi observado um aumento na produção de IFN-γ por células T $CD4^+$, nos animais infectados e tratados com prolactina (IP), quando comparados aos animais infectados e não tratados (I). Em contrapartida, a análise dos dados demonstrou uma redução significativa na produção de TNF-α, durante o 14º dia de experimento, nos animais do grupo infectado e tratado (IP), quando comparado ao grupo infectado e não submetido ao tratamento (I).

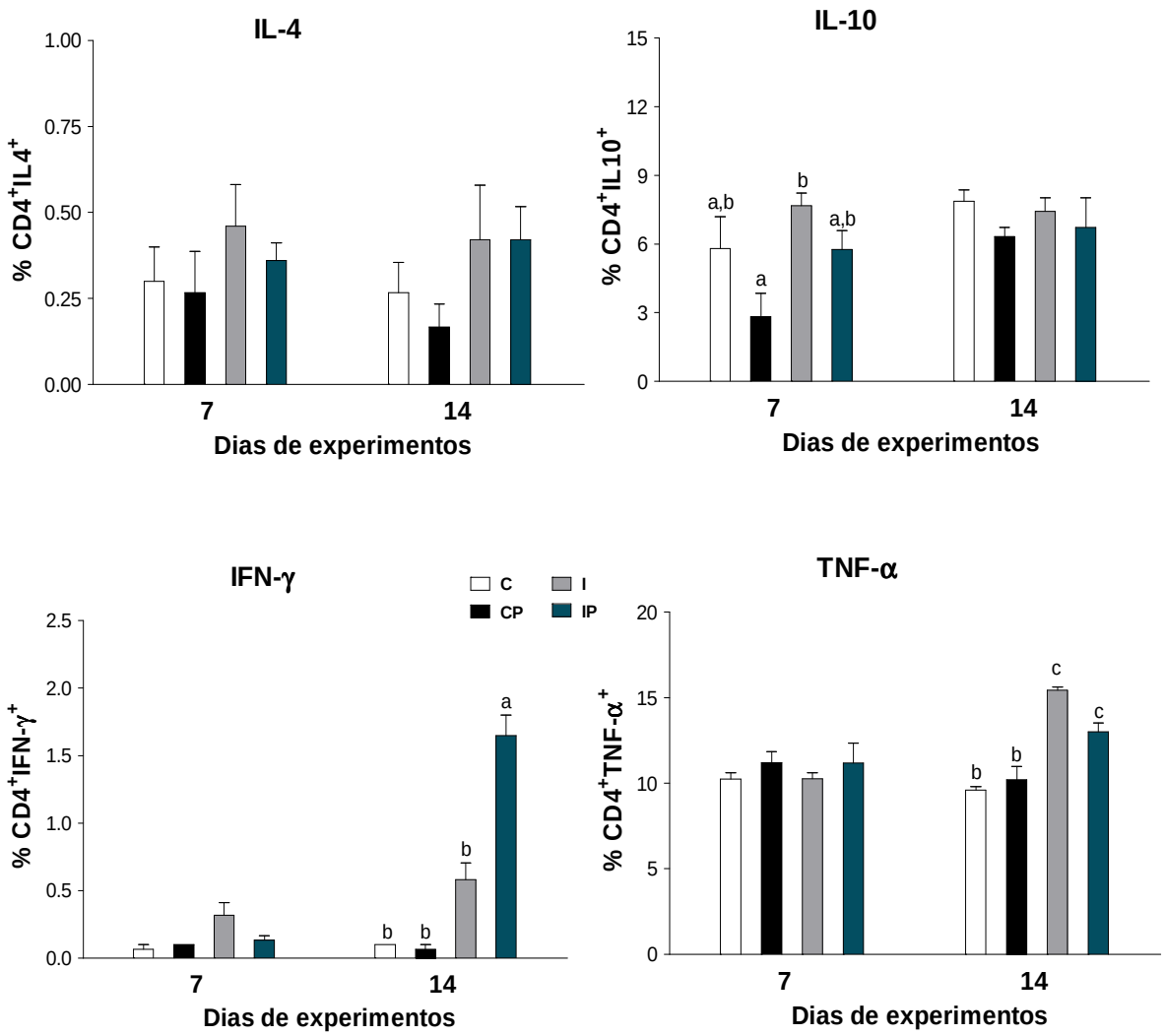


Figura 27 - Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T $CD4^+$ esplênicos de ratos Wistar durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

No 14° dia após o inóculo, os animais dos grupos infectados (I e IP) apresentaram maiores percentuais de células T CD8+IL-4+, em relação aos animais não infectados dos grupos controles (C e CP). No entanto, o tratamento dos animais com PRL não ocasionou nenhuma alteração entre o grupo tratado e o grupo não submetido ao tratamento.

Um aumento na produção de IL-10 por células T $CD8^+$ foi observado no 14º dia de experimento, entre os animais dos grupos infectados (I e IP), quando comparados aos animais controles (C e CP). Mas, o tratamento dos animais infectados com prolactina não resultou em nenhuma alteração significativa, em relação ao grupo infectado que não foi suplementado com PRL.

No 14º dia de experimento, os percentuais de células T CD8+IFN-γ + nos grupos infectados (I e IP) foram estatisticamente maiores, quando comparados com os grupos controles (C e CP). Mas, ao contrário do que ocorreu com a produção de IFN-γ por linfócitos T $CD4^+$, os resultados obtidos demonstraram uma redução no percentual de células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ, nos animais do grupo infectado e tratado com prolactina (IP), quando se comparou com o grupo infectado e não tratado (I), também durante o 14º dia de experimento. Entre os grupos controles não foram observadas diferenças significativas.

Já a avaliação dos linfócitos T $CD8^+TNF\text{-}\alpha^+$, durante o 14º dia de experimento, demonstrou que o percentual destas células nos animais do grupo infectado e tratado (IP) foi significativamente maior, quando comparado ao percentual do grupo controle sem infecção (C). No entanto, ainda nestes animais infectados e tratados, houve uma redução relevante no percentual de células T $CD8^+TNF\text{-}\alpha^+$, quando comparados aos animais infectados e sem tratamento (I).

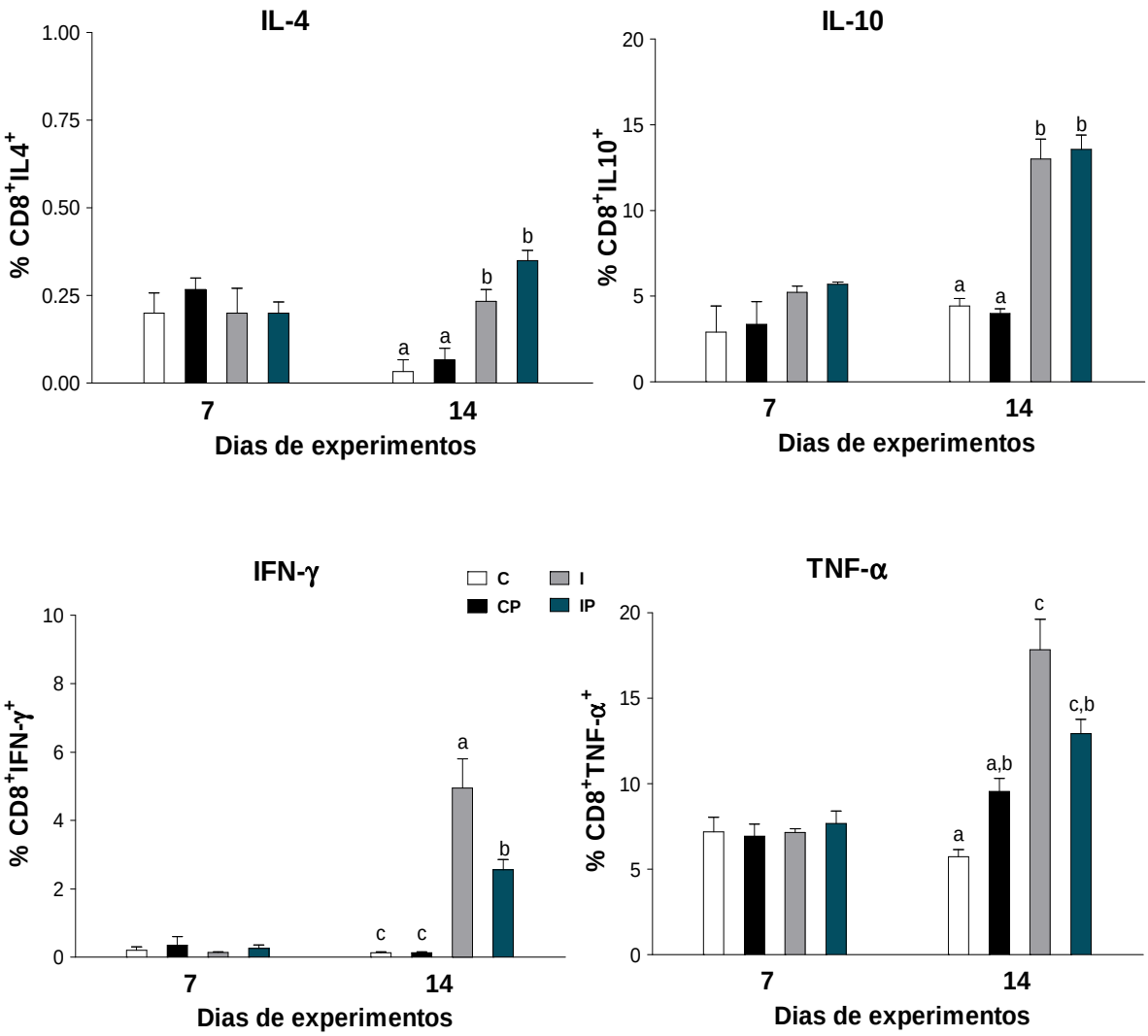


Figura 28 - Análise da produção de citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α por linfócitos T $CD8^+$ esplênicos de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

5.13 Produção de MCP-1 por células do baço

No 7º dia de experimento, a produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T $CD4^+$, foi estatisticamente maior nos animais infectados submetidos à terapia com prolactina (IP), quando comparados aos demais grupos. Entretanto, no 14º dia após infecção, o grupo infectado e tratado apresentou uma redução significativa no percentual de células T $CD4^+MCP\text{-}1^+$, em relação ao grupo infectado, sem tratamento (I), atingindo níveis semelhantes aos grupos controle, sem infecção.

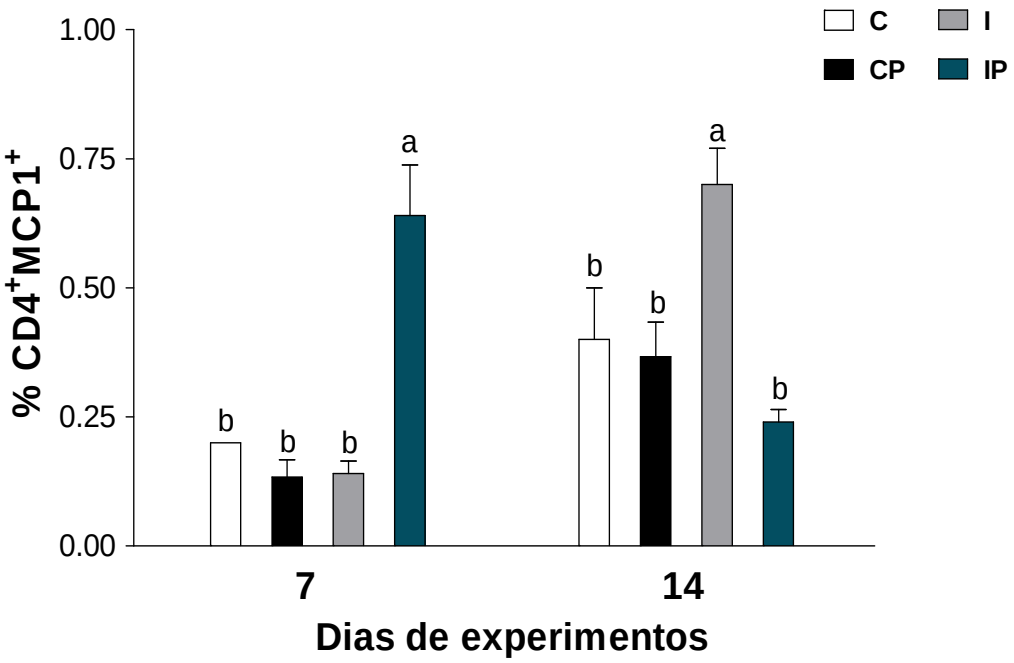


Figura 29 - Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T $CD4^+$ esplênicos de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

No 7º dia após a infecção, o tratamento dos animais infectados com prolactina resultou em um aumento no percentual de linfócitos TCD8$^+$ produtores de MCP-1.

No 14º dia de experimento, os grupos infectados (I e IP) apresentaram elevados percentuais de células T CD8$^+$MCP-1$^+$, quando comparados aos grupos controles (C e CP). Porém a administração de prolactina não ocasionou nenhuma diferença significativa no grupo infectado tratado, em relação ao grupo infectado não submetido ao tratamento.

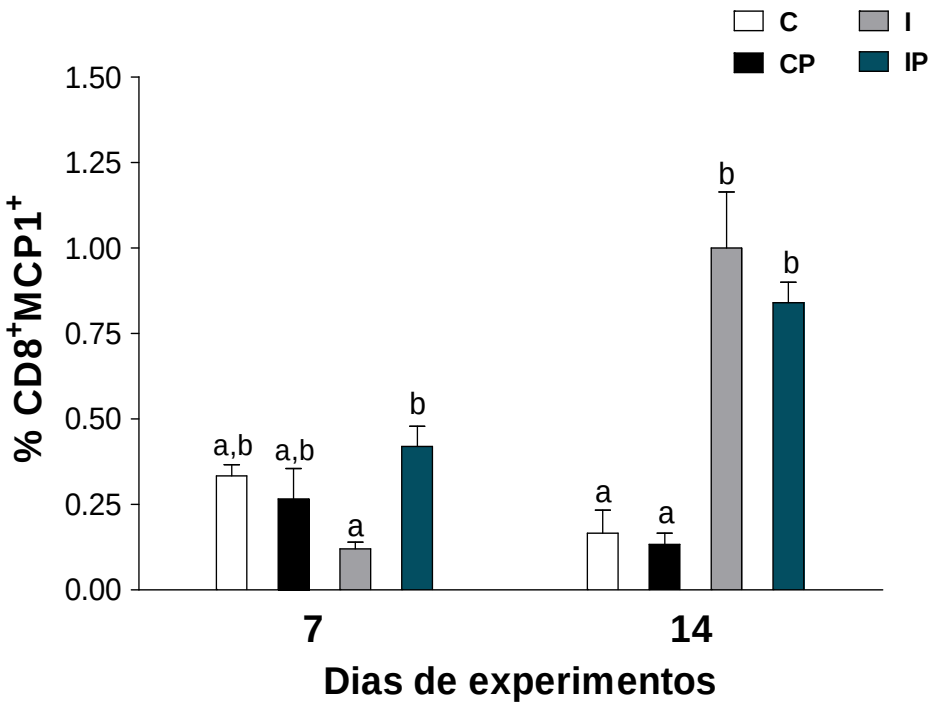


Figura 30 - Análise da produção da quimiocina MCP-1 por linfócitos T CD8$^+$ esplênicos de ratos Wistar, durante os 7º e 14° dias de experimentos, nos seguintes grupos: Controle (C), Controle tratado com Prolactina (CP), Infectado (I) e Infectado tratado com Prolactina (IP). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, $p < 0,05$ (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

6. Discussão

As ações da PRL sobre o sistema reprodutivo e sobre a lactação dos mamíferos já estão bem estabelecidas e elucidadas. No entanto, recentemente, muitas pesquisas têm demonstrado os efeitos deste hormônio sobre outros tecidos e células, diferentes daqueles envolvidos na reprodução (YU-LEE, 2002; CARREÑO et al., 2005; CLAPP et al., 2012; PARK et al., 2012). A influência da PRL sobre o sistema imune é alvo de diversos estudos clínicos e experimentais, os quais sugerem que o hormônio apresenta propriedades estimulatórias sobre as células de defesa, tais como as células T, B, NK, dendríticas, macrófagos e neutrófilos (YU-LEE, 1997; MATERA et al., 2001).

Portanto, em razão da existência de evidências que demonstraram a participação da PRL na manutenção da homeostasia do sistema imune, o objetivo central do trabalho foi avaliar os efeitos da administração deste hormônio sobre os parâmetros imunológicos do hospedeiro durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Os dados obtidos demonstraram que a prolactina é capaz de influenciar a evolução da doença experimental e aumentar a resistência do hospedeiro frente ao parasita.

Os mecanismos envolvidos no curso da infecção natural ou experimental por *T. cruzi*, bem como o desenvolvimento de diferentes formas clínicas e diferentes graus de gravidade da doença de Chagas ainda são pouco compreendidos. Acredita-se que as manifestações clínicas estejam relacionadas à complexa relação parasito/hospedeiro, podendo sofrer influências de fatores ligados ao protozoário, como virulência da cepa e tropismo, e também por características do

hospedeiro, como dimorfismo sexual, idade e perfil da resposta imune (ANDRADE et al., 1985; CARDILLO et al., 1993; PRADO et al., 1999; FERREIRA, BORGES, 2002).

Diante do fato da PRL apresentar características imunomoduladoras, a resposta imune do hospedeiro pode ser diretamente afetada pela ação deste hormônio, em casos de doenças infecciosas. Alguns autores descreveram o efeito protetor da PRL em uma variedade de infecções geralmente graves, tais como aquelas causadas por *Salmonella typhimurium* (DI CARLO et al., 1993) e *Toxoplasma gondii* (BENEDETTO et al. 1995). Estudos de Corrêa-de-Santana et al. (2009), demonstraram que a produção da PRL está reduzida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, ao contrário dos glicocorticóides, cujos níveis se encontram elevados. Os autores afirmaram ainda, que provavelmente a imunossupressão induzida pelo protozoário na fase aguda da doença, está relacionada com as alterações endócrinas, envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e seus respectivos hormônios. Já PEARSON (2007), sugere que devido às suas propriedades pró-inflamatórias, a PRL pode exercer importante papel no desenvolvimento de cardiomiopatias, durante a doença de Chagas.

Os resultados apresentados pela nossa pesquisa são complementares a estes estudos anteriores, pois indicaram que o tratamento com PRL foi capaz de influenciar a evolução da infecção experimental durante a fase a aguda, conforme demonstrado pela redução significativa nos níveis parasitêmicos durante o 7° dia após a infecção (Fig.5). Sabe-se que a parasitemia sanguínea 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 anatomopatológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993). Sendo assim, o estudo da fase aguda da infecção é de

grande importância, considerando que muitas lesões tardias são influenciadas pelo curso da doença durante esta fase (MONCAYO, YANINE, 2006).

A atividade de macrófagos é considerada relevante para a resistência do hospedeiro frente à infecção por *T. cruzi* durante a fase aguda da doença, pois além de limitar a replicação intracelular do parasito através da sua ação citotóxica, os macrófagos estão envolvidos no processo de apresentação dos antígenos, sendo também capazes de regular a atividade de outras células do sistema imune (SILVA et al., 1995; SACKS, SHER, 2002).

A influência dos macrófagos sobre o direcionamento da resposta imune pode ser mediada por vários mecanismos que envolvem principalmente, a produção de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas microbicidas, como o óxido nítrico (NO). Em infecções causadas por microrganismos intracelulares, como *T. cruzi*, o NO produzido pelos macrófagos ativados é um importante mediador biológico que atua diretamente sobre a resposta imune inata e exerce efeitos favoráveis ao hospedeiro, devido à sua ação microbicida (VESPA et al., 1994; COSTA et al., 2006; SAVINO et al., 2007).

Em 1988, Chen e Johnson descreveram que a administração *in vivo* de PRL em camundongos resultou no aumentou da produção de reativos intermediários do oxigênio (ROI) por macrófagos peritoneais (CHEN, JOHNSON, 1988). E no mesmo ano, Bernton e colaboradores (1988) relataram que, durante infecções bacterianas causadas por *Listeria* ou *Mycobacteria*, a inibição da secreção de PRL, através da administração de bromocriptina, causou a redução da ativação de macrófagos em camundongos. Os estudos de Kumar et al. (1997), também utilizando camundongos, analisaram os efeitos diretos da PRL sobre a produção de NO, e os resultados obtidos demonstraram que o tratamento *in vitro* de macrófagos

peritoneais com o hormônio, foi capaz de aumentar a ativação destas células, bem como elevar os níveis de NO no sobrenadante das culturas.

Em nossos experimentos, os resultados indicaram que durante a fase inicial da infecção, os animais submetidos ao tratamento com PRL apresentaram um aumento no número de macrófagos peritoneais, em relação aos animais infectados e não tratados (Fig.6). Adicionalmente, este grupo tratado, que demonstrou maior resistência à infecção por *T. cruzi*, em razão da redução da parasitemia, também apresentou elevados níveis de NO, quando comparados aos demais grupos, tanto nas culturas estimuladas com LPS, como nas não estimuladas (Fig.8).

É importante ressaltar que os macrófagos, além de serem células produtoras de PRL, também expressam altos níveis de PRLR, e estes fatores podem de uma forma geral, explicar a grande susceptibilidade dos macrófagos à ação da prolactina (GALA, SHEVACH, 1993; GINGRAS, MARGOLIN, 2000). A via de sinalização JAK/STAT é, provavelmente, o principal mecanismo de ação já descrito, pelo qual a PRL exerce sua influência sobre os macrófagos. Rui et al. (1992) e Lebrun et al. (1994) afirmaram que a fosforilação de proteínas celulares específicas, como as Janus Kinases (JAKs) e o próprio PRLR, é o primeiro evento bioquímico desencadeado na via de sinalização da PRL, após a ligação com seu receptor (TRIPATHI, SODHI, 2008). Este passo é seguido da criação de sítios de recrutamento de proteínas sinalizadoras, como as STATs, que se deslocam até o núcleo da célula e regulam a expressão de genes-alvo (RAWLINGS et al., 2004). Além disso, Kumar et al. (1997) demonstraram que a Proteína Kinase C (PKC) e o Ca^{2+} também estão envolvidos na ativação de macrófagos e na produção de NO por essas células. Por fim, trabalhos de Tripathi e Sodhi (2007; 2008) confirmaram o envolvimento do Ca^{2+} e de proteínas tirosina quinases e MAP quinases na produção

de NO por macrófagos tratados com PRL, concluindo que, provavelmente, várias vias de sinalização estão relacionadas com a síntese de NO por macrófagos estimulados com este hormônio (SODHI, TRIPATHI, 2008a).

A exposição das células a estímulos inflamatórios e componentes derivados de patógenos, como o LPS, aumenta a expressão das moléculas MHC II. Em contrapartida, na ausência de sinais inflamatórios ou processo infeccioso, as células apresentadoras de antígenos expressam número reduzido dessas moléculas (GUERMONPREZ et al., 2002). Nossos resultados confirmaram este fato, visto que, no 14º dia de experimento, os animais infectados por *T. cruzi* apresentaram um aumento no percentual de macrófagos expressando RT1B (MHC II) quando comparados aos animais controles não infectados. No entanto, o tratamento dos animais com prolactina não resultou em alterações significativas na expressão de RT1B em macrófagos, em relação aos animais infectados e não tratados (Fig.7).

As células NK constituem uma população de linfócitos, cujos receptores são distintos dos receptores dos linfócitos T e B, e desempenham a sua principal função na imunidade natural, devido a sua toxicidade celular (ABBAS, 2005). De uma forma geral, estas células são conhecidas por estarem envolvidas na destruição de células infectadas por vírus e células tumorais, porém, alguns autores afirmam que o recrutamento de células NK durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi* e a sua participação na ativação da resposta imune inata, são importantes na defesa do hospedeiro contra a multiplicação do parasita (BRENER, GAZZINELLI, 1997; VITELLI-AVELAR et al., 2006). Durante o início da infecção, antes mesmo da ativação da resposta imune celular adaptativa, as células NK são os principais responsáveis pela síntese de IFN-γ, citocina que atua sobre os macrófagos,

estimulando a produção de IL-12, TNF-α e NO (GAZZINELLI et al., 1993; CAMARGO et al., 1997).

Os resultados obtidos pelos nossos experimentos demonstraram ação estimuladora da PRL sobre as células NK, pois os animais infectados e submetidos ao tratamento apresentaram elevado percentual destas células, quando comparados com o grupo infectado e não tratado, durante o 14º dia de experimento (Fig.11A). Estudos anteriores já haviam relatado a influência e o envolvimento da PRL sobre as células NK, tanto em humanos, como em roedores, e demonstraram que o hormônio foi capaz de aumentar a resposta proliferativa e a ação citotóxica destas células contra tumores (CESANO et al., 1994; CHAMBERS et al., 1995; OBERHOLTZER et al., 1996; MATERA et al., 1996; MATERA et al., 1999; MATERA, MORI, 2000)

O mimetismo funcional e a cooperação com a IL-2 podem ser os principais fatores que expliquem os efeitos da PRL sobre as células NK. Sabe-se que a IL-2 é o principal fator de crescimento e ativação das células NK, e cujo receptor (IL-2R) é membro da superfamília de receptores de citocina classe I (hematopoietina), à qual também pertence o receptor da PRL (PRLR) e, além disso, tanto o IL-2R, como o PRLR, estão amplamente expressos e distribuídos nas células NK (DINARELLO, MIER, 1987; BAZAN, 1990; O'NEAL, YU-LEE, 1993; MATERA et al., 2002). Pelo fato de ambos receptores possuírem características e localização semelhantes, a IL-2 e a PRL podem compartilhar os mesmos alvos e desempenharem funções parecidas (MATERA et al., 1999). Assim como a IL-2, a PRL também atua sobre a fosforilação dos fatores de transcrição STAT-5b e IRF-1, considerados mediadores essenciais na proliferação e ativação das células NK (YU-LEE, 1997; CLEVENGER et al., 1998; DUNCAN et al., 1996; IMADA et al., 1998).

As células NKT compreendem uma pequena subpopulação de linfócitos T, que além de expressarem o receptor de célula T (TCR), também expressam marcadores encontrados nas células NK, como CD161 (em ratos) (ABBAS, 2005). As células NKT participam da regulação da resposta imune inata e adaptativa (DUTHIE et al., 2005), e ao contrário dos linfócitos T convencionais, as células NKT reconhecem antígenos lipídicos que estão ligados a moléculas similares a MHC classe I, conhecidas como CD1 (BENDELAC et al., 1995).

Estas células são capazes de proporcionar um efeito protetor contra infecções, pois, logo após serem estimuladas, passam a produzir citocinas pró-inflamatórias, como o IFN-γ, que agem na eliminação do patógeno e também citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, que limita os danos patológicos, já em um estágio tardio da infecção (CARNAUD et al., 1999; EBERL, MACDONALD, 2000; GODFREY et al., 2000). Estudos de Duthie et al. (2002) demonstraram que camundongos infectados com *T. cruzi* e deficientes em células NKT apresentaram elevados níveis de parasitemia, enquanto Vitelli-Avelar e colaboradores (2005) revelaram que a presença dessas células também contribui para a prevenção do dano tecidual induzido pela infecção.

Conforme já discutido anteriormente, no 7º dia após a infecção, os animais infectados e tratados com prolactina apresentaram parasitemia reduzida, quando comparados aos animais não tratados. Este grupo com maior resistência à infecção apresentou também um elevado percentual de células NKT, quando comparados aos demais grupos (Fig.11B), confirmando o estudo de Duthie e colaboradores (2002). Os autores relataram o envolvimento das células NKT com a infecção causada por *T. cruzi* e demonstraram que estas células estão relacionadas

com a limitação da parasitemia durante a fase aguda da doença, sendo a sua ausência capaz de tornar os animais mais susceptíveis à infecção.

O papel das células apresentadoras de antígenos (APCs) durante a infecção por *T. cruzi* é essencial, tendo em vista que estas células são capazes de ativar os mecanismos da resposta imune adaptativa na fase inicial da doença (FROSCH et al., 1997; BANCHEREAU, STEINMAN, 1998; GUERMONPREZ et al., 2002). De uma forma geral, as APCs estão localizadas na maioria dos órgãos e tecidos, e atuam capturando e processando os antígenos invasores (TAN, O'NEILL, 2005). Após a captura, estas células migram para os linfonodos e para o baço, onde irão ativar as células T naive e torná-las células T efetoras antígeno-específicas. Durante este processo de migração, as APCs perdem a habilidade de capturar e processar antígenos e aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias, como a CD80 e CD86. A ativação das células T sem a participação efetiva destas moléculas resulta em uma resposta linfoproliferativa reduzida, bem como em uma diminuição na produção de citocinas (RANDOLPH et al., 2008).

Estudos de Miyahira et al. (2003) demonstraram a importância das moléculas coestimulatórias durante a infecção causada por *T. cruzi*. De acordo com o trabalho, o bloqueio simultâneo das moléculas CD80 e CD86, através de anticorpos monoclonais específicos, resultou na exacerbação da infecção, com o aumento da parasitemia e da mortalidade dos animais infectados.

Em nossos experimentos, foram avaliados os percentuais de células apresentadoras de antígenos (CD11b/c^{+}), presentes no baço e no lavado peritoneal dos animais, e dentre estas células CD11 b/c^{+}, foi então analisada a expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86. Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que nas amostras de lavado peritoneal provenientes dos animais

infectados e tratados com PRL, o percentual de APCs e a expressão de moléculas coestimulatórias foi maior, quando comparados com o grupo infectado sem tratamento (Fig.9B e Fig.10C, 10D).

A princípio, uma das hipóteses que poderia explicar a ação moduladora da PRL sobre as APCs seria sua interação funcional com o GM-CSF, um dos principais fatores estimuladores de células dendríticas, que atua sobre a proliferação e maturação desta população celular (KIERTSCHER, ROTH, 1996; BELLONE et al., 1997). Após a análise de alterações na morfologia e variações na expressão de moléculas MHC II e coestimulatórias, Matera e colaboradores (2000) demonstraram que a PRL agiu em sinergismo com o GM-SCF, estimulando a diferenciação de monócitos em células dendríticas, *in vitro*. De acordo com os autores, a PRL sozinha não causou nenhum efeito na expressão destes marcadores, mas, agindo em conjunto com o GM-CSF, o hormônio foi capaz de elevar a expressão tanto de CD80, como de CD86, assim como ocorreu em nossos experimentos, nos animais infectados e tratados com PRL.

A importância dos linfócitos B, no mecanismo de resistência à infecção por *T. cruzi*, foi mostrada no trabalho de Cardillo e colaboradores (2007), ao infectarem animais geneticamente deficientes de células B, onde constataram que estes animais apresentavam maior susceptibilidade à infecção causada pelo protozoário, com redução do número de linfócitos T de memória. Estudos de Pascutti et al. (2003) também demonstraram que a resistência de ratos adultos à infecção aguda por *T. cruzi* ocorre em razão da adequada produção de anticorpos. Segundo Kumar e Tarleton (1998), o direcionamento da imunidade humoral é essencial no controle da infecção e a depleção de células B resulta no aumento da parasitemia, tornando os animais infectados menos resistentes à doença. No

entanto, vale ressaltar que a hipergamaglobulinemia, uma característica marcante da fase aguda da doença de Chagas, é causada pela ativação policlonal exacerbada de células B. Esta resposta policlonal é inespecífica, o que prejudica a ativação das respostas antígeno-específicas (D'IMPERIO LIMA et al., 1986; GRAUERT et al., 1993; REINA-SAN-MARTIN et al., 2000; MINOPRIO, 2002).

Devido ao seu efeito estimulatório sobre as células do sistema imune, a PRL vem sendo associada a diversas doenças auto-imunes caracterizadas pela ativação anormal de células B, como o lúpus eritematoso sistêmico (SHELLY et al., 2012). Ledesma-Soto et al. (2012), demonstraram que as células B, principalmente aquelas em estágio inicial de desenvolvimento, apresentam o receptor da PRL expresso em sua membrana plasmática, o que possibilita a atuação do hormônio na proliferação e maturação desta população celular.

Em nosso trabalho, a caracterização das subpopulações de células B durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* foi realizada através da marcação da molécula CD45RA. Os resultados obtidos de certa forma confirmaram o efeito estimulatório da PRL sobre as células B, visto que um aumento no percentual de células $CD45RA^{+}$ foi observado nos animais infectados e submetidos ao tratamento, quando comparados aos animais não tratados (Fig.12).

À medida que a infecção por *T. cruzi* progride, os mecanismos de defesa do hospedeiro passam a ser ativados, tendo como principal objetivo, o controle da replicação intracelular do parasita (D'IMPERIO LIMA et al., 1985; MINOPRIO et al., 1989; BRENER, GAZINELLI, 1997). A resposta imune adaptativa é comandada por linfócitos T CD4+ que promovem e direcionam os mecanismos de defesa efetores, como produção de interleucinas, ativação de fagócitos, proliferação de linfócitos B e T CD8+ (TARLETON, 1995). As células T CD8+ são importantes no

controle do parasitismo, pois, quando ativadas, desenvolvem uma atividade citotóxica e específica que resulta na morte das células do hospedeiro que se encontram infectadas por *T. cruzi* (MARTIN, TARLETON, 2004). Ferraz et al. (2009) demonstraram que camundongos *knockout* deficientes em linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi*, apresentando elevados níveis de parasitemia e altas taxas de mortalidade. Os autores investigaram a influência dos linfócitos T $CD4^+$ na atividade anti-*T. cruzi* de duas drogas, o benzonidazol e o posoconazol e concluíram que a ação tripanossomicida destas substâncias depende da presença destas células. De acordo com o trabalho, os linfócitos T $CD4^+$ são importantes, pois estão diretamente envolvidos nos mecanismos de ativação da resposta imune adaptativa mediada por células, a principal responsável pelo controle do parasita na fase inicial da doença.

Em nossos experimentos, as análises fenotípicas dos linfócitos T durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi,* revelaram um aumento significativo no percentual de células T $CD3^+CD4^+$ nos animais do grupo infectado e tratado com PRL, quando comparados aos animais infectados não tratados (Fig.13A). Em relação aos linfócitos T $CD8^+$, os percentuais desta subpopulação foram maiores nos grupos infectados, quando comparados aos grupos controles, sem infecção. No entanto, o tratamento com PRL não causou nenhuma alteração significativa nos animais infectados, quando comparados aos animais não submetidos ao tratamento (Fig.13B).

Sabe-se que, além da interação entre o receptor e o complexo antígeno-MHC, a completa ativação dos linfócitos T depende também da interação entre as moléculas coestimulatórias (YANG, WILSON, 1996). A ligação do CD28 com as moléculas CD80 e CD86, expressas nas células apresentadoras de

antígenos, é essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune efetora. Sem este segundo sinal, as células T são eliminadas por apoptose ou entram em estado de anergia. Desta forma, a CD28 desempenha um importante papel na diferenciação de células B e na produção de anticorpos e citocinas, além de auxiliar no recrutamento de células para sítios de inflamação através da indução da produção de quimiocinas (BOUR-JORDAN, BLUESTON, 2002).

Miyahira et al. (2003), demonstraram a importância da molécula CD28 na resistência à infecção por *T. cruzi*. Segundo os autores, animais deficientes da molécula CD28 apresentaram maior suscetibilidade à infecção por este parasita, como evidenciado pelos altos índices de parasitemia e mortalidade. Estudos de Martins et al. (2004) confirmaram a importância do co-receptor CD28, no estabelecimento de respostas específicas contra *T. cruzi*, ao verificar que os animais CD28-/- desenvolviam alta parasitemia sanguínea e tecidual. Adicionalmente, outro trabalho observou que pacientes chagásicos com complicações graves, decorrentes da forma digestiva, apresentavam uma redução na porcentagem de células $CD4^{+}CD28^{+}$, o que poderia sugerir uma falha nos mecanismos de resistência imunológica e de alguma forma contribuir para a progressão da doença (LEMOS et al., 1998).

A participação da PRL na ativação de linfócitos T já foi relatada por alguns autores. Xu et al. (2010) demonstraram a ação autócrina da PRL sobre a regulação dos mecanismos de crescimento e ativação de linfócitos T, sendo capaz de influenciar a expressão de citocinas e moléculas coestimulatórias. Já Chavez-Rueda et al. (2005) relataram que a PRL sozinha é incapaz de iniciar uma resposta imune mediada por linfócitos, requerendo a presença de um sinal antigênico ou de um mitógeno. Esta afirmação é confirmada em nossos resultados, visto que entre os

grupos controles sem infecção, o tratamento com PRL não causou nenhuma alteração no perfil da resposta imune dos animais. Porém, nos grupos infectados com *T.cruzi*, a PRL causou alterações significativas em diversos parâmetros imunológicos, incluindo o aumento na porcentagem de células apresentadoras de antígenos expressando moléculas coestimulatórias (Fig.10C, 10D).

Em nossos experimentos, os animais infectados com *T. cruzi* apresentaram altos percentuais de células T $CD4^{+}CD28^{+}$ e T $CD8^{+}CD28^{+}$, em relação aos animais controles não infectados. Porém o tratamento com prolactina não causou nenhuma alteração significativa nos níveis de expressão desta molécula coestimuladora (Fig.15).

As moléculas de adesão intercelulares, conhecidas como integrinas e selectinas, exercem importantes papéis nas interações das células T com as APCs e também na migração dos linfócitos ativados para os tecidos periféricos e sítios de infecção. A LFA-1 (CD11aCD18) é um integrina expressa em células T maduras e tem como ligante específico a molécula ICAM-1, presente em macrófagos, células dendríticas e endoteliais (EBNET et al., 1996; ABBAS, 2005). A expressão desta integrina apresenta-se aumentada após a ativação e exposição das células T aos patógenos, sendo sua participação essencial na indução das respostas imunes antígeno-específicas (MARLIN, SPRINGER, 1987; ROTHLEIN et al., 1988).

O trabalho de Montes de Oca e colaboradores (2005) relatou a ação da PRL promovendo a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, através da integrina LFA-1. Os autores afirmaram que estes efeitos sobre a adesão celular confirmam a ação imunoestimulatória da PRL durante os processos inflamatórios e infeciosos.

Os dados obtidos pelo nosso trabalho demonstraram que os percentuais de células T $CD4^{+}CD11a^{+}$ e T $CD8^{+}CD11a^{+}$ foram maiores nos animais

dos grupos infectados por *T. cruzi*, quando comparados aos animais controles. Entretanto, o tratamento dos animais com a PRL, na dose pré-estabelecida, não resultou em nenhuma diferença significativa nos percentuais de linfócitos T $CD11a^+$, em relação aos animais não tratados (Fig. 14).

Embora os mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas ainda não estejam completamente elucidados, estudos em modelos experimentais já demonstraram que a infecção causada por *T. cruzi* provoca alterações no sistema imune do hospedeiro, tais como ativação policlonal exacerbada de linfócitos e produção de autoanticorpos, que quando associadas à persistente presença do parasita, podem resultar em lesões teciduais já na fase tardia da doença. Ademais, a imunossupressão de determinados compartimentos de células T e a redução da resposta linfoproliferativa contra antígenos do parasita, também são características típicas da infecção aguda, que podem estar envolvidas com as consequências danosas presentes na fase crônica (ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1995; PINGE-FILHO et al., 1999; BRAZÃO et al., 2008).

Vários estudos têm sugerido o envolvimento da PRL na manutenção da integridade celular e seus efeitos sobre a proliferação de diversos tipos de células, tais como, linfócitos T, adipócitos, células pancreáticas e do epitélio mamário (YU-LEE et al., 1990; DeVITO et al., 1992; NANBU-WAKAO et al., 2000; DORSHKIND, HORSEMAN, 2000). De acordo com alguns autores, a PRL desempenha um papel importante na regulação, desenvolvimento e ativação dos linfócitos, sendo capaz de estimular a proliferação destas células, aumentando a sobrevivência e prevenindo a apoptose induzida pelos glicocorticoides (LAVOIE, WITORSCH, 1995; BUCKLEY, 2001; YU-LEE, 2002).

Os resultados observados em nosso trabalho são coerentes com tais afirmações, visto que tanto os esplenócitos quanto os timócitos provenientes de animais infectados e tratados com PRL apresentaram uma elevação significativa na atividade proliferativa, quando comparados aos animais infectados não submetidos ao tratamento (Fig.16 e Fig.17).

A ação estimuladora da PRL sobre as diferentes células de defesa, como linfócitos, macrófagos e células dendríticas, pode ser fundamentada no fato destas células expressarem o receptor da PRL em suas membranas (DE MELLO COELHO et al., 1998; KOOIJMAN et al., 2000; CARREÑO et al., 2004). A ligação da PRL ao seu receptor resulta na ativação da via de sinalização JAK/STAT, que por sua vez, culmina na transcrição de genes alvos no núcleo da célula. No entanto, outros mecanismos sinalizadores também podem ser ativados após estimulação da PRL. Estes mecanismos alternativos geralmente envolvem proteínas tirosina quinases, como por exemplo, a MAPK, a jun-quinase (JNK) e a PKC (CLEVENGER, KLINE, 2001). Portanto, as ações da PRL sobre a proliferação, apoptose e diferenciação das células dependem da coordenação e das interações entre todas as vias de sinalização ativadas, bem como do seu sinergismo com outras citocinas, especialmente a IL-2 e o IFN-γ.

A apoptose é um processo de morte celular caracterizado pela clivagem do DNA, condensação e fragmentação nuclear, bem como vesiculação e alterações na distribuição lipídica da membrana plasmática. A indução deste processo envolve a ativação de enzimas citosólicas conhecidas como caspases, que podem ser efetoras ou executoras; nos linfócitos, a ativação de uma caspase e a posterior apoptose podem ser induzidas por vias distintas, uma das quais está

associada a alterações na permeabilidade mitocondrial (passiva) e a outra a sinais originados dos receptores da membrana plasmática (induzida) (ABBAS, 2005).

Lopes e colaboradores (1995) relataram a importância do processo de morte induzida de linfócitos T, principalmente $CD4^+$, durante a infecção causada por *T. cruzi* e sugeriram que a apoptose de células T maduras seria uma característica marcante da doença, com participação na imunossupressão e persistência do parasita no hospedeiro. Este estudo demonstrou que células T provenientes do baço de animais infectados apresentaram viabilidade reduzida, após estimulação *in vitro* e que, embora ocorram por mecanismos diferentes, tanto os linfócitos T $CD4^+$, quanto T $CD8^+$, sofrem apoptose durante a infecção experimental. Outros experimentos também demonstraram o papel da apoptose na patogenia da doença de Chagas experimental e inclusive afirmaram que o bloqueio deste processo seria uma intervenção com grande potencial terapêutico (NUNES et al., 1998; FREIRE-DE-LIMA et al., 2000; DOSREIS et al., 2005; SILVA et al., 2007; MONTALVÃO et al., 2010). Além do baço, a morte celular por apoptose também ocorre em outros locais, como linfonodos e coração (ZHANG et al., 1999; de MEIS et al., 2006).

A severa atrofia tímica presente na fase aguda da doença de Chagas é caracterizada principalmente, pela intensa depleção de timócitos corticais imaturos, estando diretamente relacionada com altos níveis plasmáticos de glicocorticoides. Recentemente, Lepletier e colaboradores (2012) consideraram a importância da PRL na prevenção da apoptose destes timócitos e sugeriram que a homeostase do timo durante a infecção depende do equilíbrio entre os níveis de PRL e de glicocorticoides, bem como de seus respectivos receptores.

Estudos *in vitro* do grupo de Witorsch relataram a atuação da PRL como um estímulo de sobrevivência sobre células do sistema imune (WITORSCH et

al., 1993; FLETCHER-CHIAPPINI et al., 1993; LAVOIE, WITORSCH, 1995). Nestes trabalhos, os autores demonstraram que, através de seu efeito anti-apoptótico, a PRL foi capaz de reverter o processo de morte celular induzido por glicocorticoides sobre células da linhagem Nb2, provenientes de linfoma. De acordo Krishnan et al. (2003), animais com elevados níveis plasmáticos de PRL apresentaram diminuição na exposição de fosfatidilserina na superfície das células T do baço e do timo, além da inibição da ativação da caspase-3 e redução na fragmentação de DNA.

O estímulo da PRL sobre a sobrevivência de determinadas subpopulações de linfócitos T provavelmente é resultado da sua capacidade de aumentar a expressão de genes anti-apoptóticos da família Bcl, como o blc-2 e o bcl-x (BUCKLEY, BUCKLEY, 2000; BUCKLEY, 2001; KRISHNAN et al., 2003). Estes genes e suas proteínas codificadas inibem a apoptose por impedirem a liberação do citocromo *c* e por inibirem a ativação da caspase-9 (ABBAS, 2005). Estudos de Leff et al. (1996) demonstraram que a adição de PRL em culturas de células Nb2 aumentou a expressão de bcl-2, elevando os níveis de seu RNAm e de sua respectiva proteína.

Desta forma, nossos experimentos condizem com os trabalhos citados acima, visto que as células esplênicas dos animais pertencentes ao grupo infectado apresentaram elevados percentuais de apoptose (estágio recente ou tardio) e reduzidos índices de viabilidade, quando comparadas aos animais dos grupos controles, sem infecção. Em contrapartida, os resultados obtidos demonstraram que a administração de PRL nos animais infectados foi capaz de elevar a viabilidade de esplenócitos, bem como reduzir os percentuais de células apoptóticas, tanto no estágio recente, como tardio, quando comparados com os animais sem tratamento (Fig.18 e Fig.19).

A imunidade mediada por células é considerada um dos principais mecanismos responsáveis pelo controle do parasita durante a fase aguda da doença de Chagas. As interações iniciais com *T. cruzi* e o desenvolvimento de um microambiente rico em citocinas direcionam a ativação de macrófagos e linfócitos, células essenciais na limitação da multiplicação parasitária (TRISCHMANN, 1984; BRENER, GAZZINELLI, 1997; DOSREIS et al., 2007; DUTRA, GOLLOB, 2008).

Em nossos experimentos, a análise de citocinas intracelulares em culturas de esplenócitos, permitiu a observação de uma resposta caracteristicamente pró-inflamatória durante a infecção por *T. cruzi*. No 14° dia após o inoculo, os animais infectados apresentaram um significativo aumento na produção de IFN-γ e TNF-α, quando comparados aos animais controles (Fig.21 e Fig.22).

O IFN-γ é um importante mediador da resistência a *T. cruzi*, sendo capaz de exercer múltiplos efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro. Além da enzima iNOs, o IFN-γ também aumenta a expressão de moléculas MHC e de genes de quimiocinas e seus receptores (GAZZINELLI et al., 1992; HÖLSCHER et al., 1998; ALIBERTI et al., 2001). Recentemente, Rodrigues e colaboradores demonstraram que o IFN-γ desempenha um papel crucial e único no controle à infecção aguda causada pela cepa G de *T. cruzi* (RODRIGUES et al., 2012). Entretanto, vale lembrar que a persistência de altos níveis de IFN-γ durante a fase tardia da doença de Chagas, pode estar relacionada com o surgimento dos sintomas característicos da fase crônica, como a cardiomiopatia chagásica (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; ARANTES et al., 2004; ROCHA-RODRIGUES et al., 2012) .

Em nossos resultados, os animais infectados e submetidos ao tratamento com PRL, apresentaram maior produção de IFN-γ por linfócitos T $CD4^+$,

quando comparados aos animais infectados e não tratados (Fig.21). Estes dados corroboram com trabalhos anteriores que também relataram a ação estimuladora da PRL sobre a produção de IFN-γ. Estudos de Cesario et al. (1994), utilizando culturas de células mononucleares de sangue periférico, demonstraram que em determinadas concentrações, a PRL foi capaz de elevar a produção desta citocina. Já Chavez-Rueda e colaboradores (2005) avaliaram o efeito da PRL sobre a secreção de IFN-γ por linfócitos T $CD4^+$ e verificaram que a adição de anticorpos anti-hPRL nas culturas reduziu a produção de IFN-γ pelas células.

Diferentemente do que ocorreu nos linfócitos T $CD4^+$, a produção de IFN-γ por células T $CD8^+$ foi menor no grupo infectado e tratado com PRL, em relação ao grupo infectado sem tratamento, sendo esta redução evidenciada no 14° após o inoculo (Fig.22). É importante sugerir que na fase tardia da doença, esta diminuição no percentual de linfócitos T $CD8^+$ efetores e produtores de citocinas pode ser uma tendência benéfica ao hospedeiro, tendo em vista a predominância destas células no infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos, o que reforça o envolvimento das mesmas nas lesões teciduais (TOSTES JÚNIOR et al., 1994).

A evolução da doença de Chagas experimental pode ser diretamente influenciada por fatores imunológicos e também endócrinos (ROGGERO et al., 2006). Estudos de Roggero e colaboradores demonstraram que a patogenia e os danos teciduais da doença podem estar associados a processos inflamatórios exacerbados, que ocorrem durante a infecção aguda por *T. cruzi* (ROGGERO et al., 2002, 2004). Esta intensa reação inflamatória é acompanhada pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, geralmente induzida pelas citocinas IL-1, IL-6 e TNF-α (BESEDOVSKY, DEL REY, 1996). Esta ativação do eixo HPA é importante, pois

resulta em um aumento na liberação de glicocorticoides que contribuem para o controle dos efeitos deletérios no hospedeiro, causados pelo excesso de mediadores inflamatórios. Entretanto, a presença de distúrbios ou um desequilíbrio neste sistema imuno-endócrino integrado podem levar a um descontrole nos mecanismos imunológicos e à produção exagerada de mediadores inflamatórios, resultando em lesões teciduais, bem como piora na evolução da doença e morte do hospedeiro (ROGGERO et al., 2006).

Neste contexto, conclui-se que o papel do TNF-α durante a infecção pode ser bastante complexo, pois ao mesmo tempo em que esta citocina pró-inflamatória exerce uma função favorável ao hospedeiro, no controle do parasita na fase aguda, a sua produção exacerbada contribui para o desenvolvimento dos processos patológicos da doença (CASTAÑOS-VELEZ et al., 1998; SILVA et al., 1995; TRUYENS et al., 1995; SOUZA et al., 2004; DE ARAÚJO et al., 2012).

Nossos resultados confirmaram trabalhos anteriores que relataram o aumento da produção de TNF-α durante a infecção causada por *T. cruzi*, pois, no 14° dia após o inoculo, a análise de citocinas intracelulares em células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ demonstrou que os níveis de TNF-α estavam aumentados nos animais infectados, quando comparados aos animais não infectados dos grupos controles (PINGE-FILHO et al., 1999; FILIPIN et al., 2010; REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012; SANTELLO et al., 2012). Porém, entre os grupos infectados, tratado e não tratado, não houve diferenças significativas nos percentuais de TNF-α, ou seja, o tratamento com PRL não causou alterações na produção desta citocina (Fig.21 e Fig.22).

Alguns autores sugeriram que o padrão de resistência ou susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* pode estar associado ao tipo de citocinas produzidas pelos linfócitos T ativados (SILVA et al., 1992; HOFT et al., 1993;

MACHADO et al., 2012a,b). Os linfócitos do tipo Th1 produzem citocinas, como a IL-2, IFN-γ e TNF-α, que induzem respostas mediadas por células, enquanto as células do tipo Th2 secretam a IL-4 e IL-10, que são essenciais para as respostas humorais (ABBAS, 2005;). A participação das citocinas Th1 na evolução da doença de Chagas é responsável por promover a resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção, tendo como principal ação a eliminação do parasita intracelular (MINOPRIO et al., 1993; TALVANI et al., 2000). Por sua vez, as citocinas Th2 promoveriam a susceptibilidade e exacerbação da infecção (REED et al., 1994) .

A IL-10 inibe a expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras nos macrófagos, reduzindo a capacidade destas células em apresentar antígenos (de WAAL MALEFYT et al., 1991). Estudos demonstraram que animais deficientes em IL-10 controlaram de forma mais eficiente a infecção por *T.cruzi*, reduzindo os níveis de parasitemia e aumentando os níveis de NO e citocinas Th1 (SILVA et al., 1991; ABRAHAMSOHN, COFFMAN, 1996; CARDILLO et al., 1996; HUNTER et al., 1997). Em contrapartida, a supressão da proliferação de células T e a redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias causadas pela IL-10, amenizam os danos e lesões nos tecidos do hospedeiro (FIORENTINO et al., 1991; ADORINI, 2003). Animais com deficiência nesta citocina sucumbem rapidamente à infecção, provavelmente devido ao efeito exacerbado na ativação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (HÖLSCHER et al., 2000).

Apesar do relato de alguns autores sobre os efeitos da PRL na produção de IL-10 (MATALKA, 2003; BRAND et al., 2004; CARREÑO et al., 2004; SODHI, TRIPATHI, 2008b; XU et al., 2010; DZITKO et al., 2012), nenhuma alteração nos níveis de IL-10 foi verificada no grupo infectado tratado, em relação ao grupo infectado e não submetido ao tratamento com PRL (Fig.21 e Fig.22).

A IL-4 é outra interleucina que apresenta papel fundamental para o controle do processo inflamatório tecidual, durante a fase crônica da infecção (SOARES et al., 2001). De acordo com Talvani e colaboradores (2000), os animais com maior resistência à infecção por *T.cruzi* e com predominância do padrão de citocinas Th1 na fase inicial, apresentam posteriormente, um desvio da resposta para um padrão Th2 em estágios tardios da doença. Adicionalmente, estudos conduzidos por Soares et al. (2001) revelaram que a ausência de IL-4, em camundongos *knockout* resulta em um processo inflamatório exacerbado no miocárdio, constituído predominantemente por células mononucleares. Ainda, de acordo com os referidos autores, a IL-4 é capaz de regular a produção de IFN-γ, contribuindo na prevenção do dano tecidual, observado no coração de animais infectados por *T. cruzi*.

A relação entre a PRL e a IL-4 já foram descritas por alguns autores. De acordo com estudos *in vitro* de Xu et al. (2010), a síntese de IL-4 apresentou-se reduzida em células T que não expressavam o receptor para PRL (PRLR). Já Gerlo e colaboradores (2005) afirmaram que a produção de PRL por linfócitos T depende da regulação de citocinas e neste caso, a IL-4 agiria sobre estas células reduzindo os níveis de PRL mRNA. Em contrapartida, Dimitrov et al. (2004) não observaram alterações na produção de IL-4 por células $CD4^+$, após a adição de PRL.

Em nossos estudos, observou-se que, no 14° após a infecção, os percentuais de células T $CD8^+IL\text{-}4^+$ foram maiores nos animais infectados, em relação aos animais controles (Fig.22). Entretanto, o tratamento dos animais com PRL não resultou em nenhuma alteração significativa na produção de IL-4 por linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$ (Fig.21 e Fig.22).

A migração de células aos tecidos durante o processo inflamatório é um passo fundamental e envolve o rolamento destas células, adesão firme ao endotélio, migração transendotelial e seu deslocamento para o tecido (SPRINGER, 1994; ABBAS, 2005; MONTES DE OCA, 2005).

A quimiocina MCP-1 é um potente quimioatraente para monócitos, células T e células NK (LOETSCHER et al., 1996). Estudos relataram a participação desta quimiocina durante a evolução da doença de Chagas experimental, aumentando o potencial microbicida dos macrófagos, através da produção de óxido nítrico, sendo importante na limitação da replicação do parasito (VILLALTA et al., 1998; BISWAS et al., 2001; COELHO et al., 2002).

Adicionalmente, estudos conduzidos por Paiva et al. (2009) revelaram que a ausência de MCP-1, em camundongos *knockout* resulta em um aumento da parasitemia, com consequente morte dos animais quando comparado aos animais do grupo controle. Tais autores também evidenciaram que os macrófagos peritoneais de animais deficientes em MCP-1 apresentavam reduzida atividade tripanossomicida.

Dados de Sodhi e Tripathi (2008b) indicam que a prolactina é capaz de induzir um aumento na produção de MCP-1 por macrófagos. Corroborando com os estudos previamente citados, demonstramos em nossos experimentos que a terapia dos animais com prolactina resultou em aumento dos níveis de MCP-1 (7º dia após a infecção), quando comparados aos animais infectados sem tratamento.

No entanto, o recrutamento excessivo de leucócitos, devido à expressão de quimiocinas, pode estar implicado na patogênese de diversas doenças inflamatórias agudas e crônicas (PROUDFOOT, 2002) como, por exemplo, asma

(WALSH, 2006), esclerose múltipla (TSUNODA et al., 2004) artrite reumatóide (DAWSON et al., 2003), e doenças inflamatórias intestinais (MACDERMOTT, 1999).

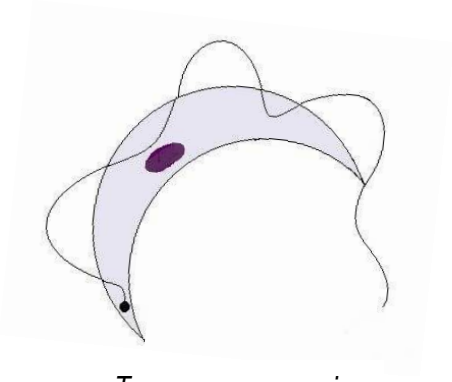
Inúmeros aspectos envolvidos na imunopatogênese da doença de Chagas ainda não foram totalmente esclarecidos. No entanto, o estudo das quimiocinas nos últimos anos tem contribuído para o entendimento do seu papel no estabelecimento e manutenção da miocardite induzida pela infecção por *T. cruzi* (AUKRUST et al., 1998; 2001, DOS SANTOS et al., 2001). Neste contexto, Talvani e colaboradores (2000; 2004) demonstraram que níveis plasmáticos elevados da quimiocina CCL2/MCP-1, estão diretamente correlacionados ao dano cardíaco em pacientes chagásicos cardiopatas.

Teixeira et al. (2002) avaliaram a prevalência de quimiocinas indutíveis por IFN-γ, como MCP-1/CCL-2, em lesões cardíacas de camundongos com 120 dias de infecção por *T. cruzi*. Resultados similares foram obtidos em outro trabalho (AUKRUST et al., 1998) utilizando monócitos do sangue periférico de pacientes com falência cardíaca congestiva, os quais produziam altos níveis das quimiocinas MCP-1 e MIP-α, indicando uma correlação positiva entre os níveis de quimicionas e a gravidade das lesões cardíacas. É interessante ressaltar, que em nosso modelo experimental, níveis acentuados de MCP-1 em células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ foram observados nos grupos submetidos à terapia de prolactina (Fig.23 e Fig.24). No entanto, durante a evolução da infecção experimental, no 14° dia após a infecção, observou-se uma ação antagônica da prolactina, com reduzidos níveis de MCP-1 nos animais tratados, quando comparado aos animais do grupo controle (Fig.23).

Tendo em vista os efeitos positivos da PRL sobre a produção de determinadas citocinas e quimiocinas, especialmente, as pró-inflamatórias, estudos de Sodhi e Tripathi (2008a) sugeriram os possíveis mecanismos de sinalização

responsáveis pela ação imunomodulatória da PRL sobre os macrófagos. De acordo com os autores, além da via de sinalização JAK/STAT, outras moléculas sinalizadoras, como a MAP Kinase p38 e o fator de transcrição NF-kB, também poderiam estar envolvidas no direcionamento da produção de citocinas por macrófagos, após o tratamento com PRL. Adicionalmente, os autores ainda afirmaram que a dose e a concentração de PRL podem influenciar na expressão destes sinalizadores e consequentemente na produção das citocinas.

Desta forma, o estudo ora realizado comprovou a influência da PRL sobre os diferentes aspectos da resposta imune, sendo capaz de reduzir a carga parasitária durante a fase aguda da doença de Chagas, aumentando a resistência do hospedeiro frente ao parasita. Em virtude dos resultados animadores, é interessante que estes mesmos parâmetros sejam analisados também durante a fase crônica da doença, tendo em vista o estabelecimento de uma correlação entre o direcionamento da resposta pró-inflamatória durante o inicio da infecção as consequências deste processo na patogenia da doença.

Prolactina → 

Trypanosoma cruzi

Parâmetros analisados	Resultado[1]	Dias após a infecção
Parasitemia	↓	7º
NO	↑	7º
Macrófagos peritoneais	↑	7º
Apoptose de esplenócitos	↓	7º e 14º
Proliferação de esplenócitos e timócitos	↑	7º e 14º
Expressão das moléculas coestimulatórias em células apresentadoras de antígenos	↑	14º
Células NK e linfócitos B	↑	14º
Linfócitos T $CD3^+CD4^+$	↑	14º
Linfócitos T $CD3^+CD8^+$	Sem alteração	-
Linfócitos T $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$	↑	14º
Linfócitos T $CD4^+TNF\text{-}\alpha^+$	Sem alteração	-
Linfócitos T $CD4^+IL\text{-}10^+$ e $CD4^+IL\text{-}4^+$	Sem alteração	-
Expressão das moléculas CD11a e CD28	Sem alteração	-

Tabela 1 - Representação qualitativa dos resultados obtidos no estudo.

[1] As setas indicam redução ou aumento nos níveis dos parâmetros avaliados

7. Considerações finais

Os dados obtidos neste trabalho confirmam uma relação íntima e coordenada entre os sistemas imunológico e neuroendócrino. As evidências sugerem que a PRL possui uma importância relevante não apenas no tocante às suas ações fisiológicas, mas também nas interações neuro-imuno-endócrinas, agindo como uma substância versátil de ação pleiotrópica capaz de influenciar diversos parâmetros da resposta imune durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Diante disto, a PRL poderia assumir um papel coadjuvante ao tratamento medicamentoso convencional, sendo importante considerar neste caso, a realização de uma análise de risco, avaliando-se fatores de toxicidade e dose.

Os mecanismos de ação da PRL sobre o sistema imunológico ainda não estão totalmente compreendidos e elucidados e, portanto, muitas pesquisas complementares ainda necessitam ser realizadas neste campo.

8. Referências Bibliográficas

Abbas, KA, Lichtman AH. Imunologia Celular e Molecular, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Abrahamsohn IA, Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *T.cruzi* infection. Journal of Immunology. 1995; 155: 3955-3963.

Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. Exp Parasitol. 1996; 84(2): 231-244.

Adorini L. Cytokine-based immunointervention in the treatment of autoimmune diseases. Clin Exp Immunol. 2003; 132(2): 185-192.

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.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol. 2001; 2(8):675-680.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006; 124(4): 783-801.

Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotas. Infection and Immunity. 1996; 64: 1961-1967.

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 2001; 158(4): 1433-1440.

Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps cysticercosis*. Parasitol Res. 2007; 100(6):1341-1350.

Andersson J, Englund P, Sunnemark D, Dahlstedt A, Westerblad H, Nennesmo I, Orn A, Lundberg IE. CBA/J mice infected with *Trypanosoma cruzi*: an experimental model for inflammatory myopathies. Muscle Nerve. 2003; 27: 442-448.

Andrade SG. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1976; 18: 140-144.

Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. Braz J Med Biol Res. 1985; 18(4): 499-506.

Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 30: 27-35.

Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1): 71-80.

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol. 2005; 3(10): 819-823.

Andrade LO, Galvão LM, Meirelles Mde N, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an *in vitro* study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(6): 834-837.

Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. Immunol Rev. 2003; 192:161-180.

Arantes RM, Marche HH, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Am J Pathol. 2004; 164(4): 1361-1368.

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

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

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

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392, 245-252.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18: 767-811.

Bayoumi NK, Elhassan EM, Elbashir MI, Adam I. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. Ann Trop Med Parasitol. 2009; 103(2): 111-117.

Bazan JF. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. Cell. 1990; 61(5): 753-754.

Bellone G, Astarita P, Artusio E, Silvestri S, Mareschi K, Turletti A, Buttiglieri S, Emanuelli G, Matera L. Bone marrow stroma-derived prolactin is involved in basal and platelet-activating factor-stimulated in vitro erythropoiesis. Blood. 1997; 90(1): 21-27.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. Endocr Rev. 1996; 17(6): 639-669.

Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? Endocr Rev. 2008; 29(1): 1-41.

Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. Science. 1995; 268(5212): 863-865.

Benedetto N, Folgore A, Galdiero M, Meli R, Di Carlo R. Effect of prolactin, rIFN-gamma or rTNF-alpha in murine toxoplasmosis. Pathol Biol. 1995; 43: 395-400.

Berczi I, Nagy E, De Toledo SM, Matusik RJ, Friesen HG. Pituitary hormones regulate c-myc and DNA synthesis in lymphoid tissue. Journal of Immunology. 1991; 146: 2201-2206.

Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mieloide crônica e o sistema Fas-FasL. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2005; 27(2): 120-125.

Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. Curr Opin Infect Dis. 2008; 21: 476-482.

Bernton EW, Meltzer MS, Holaday JW. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemia. Science. 1988; 239: 401–404.

Berwaer M, Martial JA, Davis Jr. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. Mol Endocrinol. 1994; 8(5): 635-642.

Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocr Rev. 1996; 17(1): 64-102.

Besedovsky HO, del Rey A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. Z Rheumatol. 2000; 59(2): II/26-30.

Biswas SK, Sodhi A, Paul S. Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated in vitro with chemokine monocyte chemoattractant protein 1. Nitric Oxide. 2001; 6: 566-579.

Biswas R, Roy T, Chattopadhyay U. Prolactin induced reversal of glucocorticoid mediated apoptosis of immature cortical thymocytes is abrogated by induction of tumor. J Neuroimmunol. 2006; 171: 120-134.

Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, Mork S, Choi S, Kong PA, Hanley D, Trapp BD. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. Ann Neurol. 1994, 36: 778-786

Bolander FF Jr. The role of nitric oxide in the biological activity of prolactin in the mouse mammary gland. Molecular and Cellular Endocrinology. 2001; 174: 91-98.

Bolander FF Jr. Prolactin activation of mammary nitric oxide synthase: molecular mechanisms. J Mol Endocrinol. 2002; 28(1): 45-51.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocrine Reviews. 1998; 19: 225-268.

Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo JP, Kelly PA. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. J Immunol. 1999; 163(2): 576-582.

Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. J Clin Immunol. 2002; 22: 1-7.

Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. Eur Cytokine Netw. 2004; 15(2): 99-104.

Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochemistry (Mosc). 2005; 70: 231-239.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian Consensus on Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38 (3): 7-29.

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

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

Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1971; 13: 171-178.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 1997; 114(2): 103-110.

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

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 122-135.

Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. Int Immunopharmacol. 2001; 1(8): 1457-1467.

Buckley AR, Crowe PD, Russell DH. Rapid activation of a protein kinase C in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85: 8649-8653.

Buckley AR, Buckley DJ. Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells. Ann N Y Acad Sci. 2000; 917: 522-533.

Buckley AR. Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. Lupus. 2001; 10: 684-690.

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. Parasitology Research. 2007; 100: 1407-1410.

Cabrera G, Barría C, Fernández C, Sepúlveda S, Valenzuela L, Kemmerling U, Galanti N. DNA repair BER pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi.* J Cell Biochem. 2011; 112(8): 2189-2199.

Caetano LC, Zucoloto S, Kawasse LM, Toldo MP, Do Prado JC Jr. Does cyclophosphamide play a protective role against neuronal loss in chronic *T. cruzi* infection?. Dig Dis Sci. 2008; 53(11): 2929-2934.

Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J Immunol. 1997; 159: 6131-6139.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol. 2001; 167(1): 416-23.

Cardillo F, Falcão RP, Rossi MA, Mengel J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Eur J Immunol. 1993; 23(10): 2597-2605.

Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. Infect Immun. 1996; 64(1): 128-134.

Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology. 2007; 122: 584-595.

Carlier Y, Dias JCP, Luquetti AO, Hontebeyrie M, Torrico F, Truyens C. Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. Enciclopédie Médico-Chirurgicale. 2002; 8: 505-520.

Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. J Immunol. 1999; 163(9): 4647-4650.

Carreño PC, Jiménez E, Sacedón R, Vicente A, Zapata AG. Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. J Neuroimmunol. 2004; 153: 83-90.

Carreño PC, Sacedón R, Jiménez E, Vicente A, Zapata AG. Prolactin affects both survival and differentiation of Tcell progenitors. J Neuroimmunol. 2005; 160: 135-145.

Castaños-Velez E, Maerlan S, Osorio LM, Aberg F, Biberfeld P, Orn A, Rottenberg ME. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. Infect Immun. 1998; 66(6): 2960-2968.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med. 1994; 180(4): 1263-1272.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Chagas disease after organ transplantation - Los Angeles, California, United States 2006. MMWR 55 (29): 798-800.

Cesano A, Oberholtzer E, Contarini M, Geuna M, Bellone G, Matera L. Independent and synergistic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors. Immunopharmacology. 1994; 28:67-75.

Cesario TC, Yousefi S, Carandang G. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. Proc Sot Exp Biol Med. 1994; 205: 89-95.

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

Chambers WH, Amoscato AA, Smith MS, Kenniston TW, Herberman RB, Appasamy PM. Prolactin receptor expression by rat NK cells. Nat Immunol. 1995; 14: 145-156.

Chaussabel D, Pajak B, Vercruysse V, Bisseyé C, Garzé V, Habib M, Goldman M, Moser M, Vray B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Lab Invest. 2003; 83(9): 1373-1382.

Chavez-Rueda K, Hérnández J, Zenteno E, Leaños-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. Clinical Immunology. 2005; 116: 182-191.

Chen HW, Hamer DH, Heiniger HJ, Meier H. Stimulation of hepatic RNA synthesis in dwarf mice by ovine prolactin. Biochim Biophys Acta. 1972; 287(1): 90-97.

Chen Y, Johnson AG. In vivo activation of macrophages by prolactin from young and aging mice. Int J Immunopharmacol. 1988; 15: 39-45.

Clapp C, Martínez de la Escalera L, Martínez de la Escalera G. Prolactin and blood vessels: a comparative endocrinology perspective. Gen Comp Endocrinol. 2012; 176(3): 336-340.

Clarke DL, Arey BJ, Linzer DIH. Prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during rat estrous cycle. Endocrinology. 1993; 133: 2594-2603.

Clevenger CV, Sillman AL, Prystowsky MB. Interleukin-2 driven nuclear translocation of prolactin in cloned T-lymphocytes. Endocrinology. 1990; 127: 3151-3159.

Clevenger CV, Freier DO, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. J Endocrinol. 1998; 157(2): 187-197.

Clevenger CV, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction. Lupus; 2001; 10(10): 706-718.

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

Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, Silva JS, Canizzaro H, Gazzinelli RT, Teixeira MM. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. J Leukoc Biol. 2002; 71(5): 837-844.

Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez-Pinto D, Grimaldi C, Diamond B. Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. Lúpus. 2008; 17: 528-532.

Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. Genome Biol. 2005; 6: 223.

Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MO, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LM: The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 253-255.

Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Renner U, Stalla J, Stalla GK, Savino W. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi*-infected mammosomatotrophic cells. 2009; 16(3): 208-212.

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. Journal of Immunology. 2006; 177: 3193-3200.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1):31-40.

Crowe PD, Buckley AR, Zorn NE, Rui H. Prolactin activates protein kinase C and stimulates growth-related gene expression in rat liver. Mol Cell Endocrinol. 1991; 79: 29-35.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(8): 3541-3545.

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 1996; 98(8): 1709-1712.

Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Mady C, Lanni B, Stolf N, Fiorelli A, Honorato R, Kalil J. New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(3): 59-62.

Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. Autoimmun Rev. 2011; 10 (3): 163-165.

Dardenne M, de Morales MCL, Kelly PA, Gagnerault MC. Prolactin receptor expression in human haematopoietic tissue analysed by flow cytofluorimetry. Endocrinology. 1994; 134: 2108-2014.

Davis JA, Linzer DI. Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. Mol Endocrinol. 1989; 3(4): 674-680.

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

De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. Prolactin and Autoimmunity. Pituitary. 2005; 8: 25-30.

de Meis J, Mendes-da-Cruz DA, Farias-de-Oliveira DA, Corrêa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Savino W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. Microbes Infect. 2006; 8(1): 221-231.

De Mello-Coelho V, Savino W, Postel-Vinay MC, Dardenne M. Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. Dev Immunol. 1998; 6(3-4): 317-323.

De Rosa M, Zarrilli S, Di Sarno A, Milano N, Gaccione M, Boggia B, Lombardi G, Colao A. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. Endocrine. 2003; 20: 75–82.

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010; pii: 295394.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med. 1991; 174(5): 1209-1220.

Denicola A, Rubbo H, Rodríguez D, Radi R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi.* Arch Biochem Biophys. 1993; 304(1): 279-286.

DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. Endocrinology. 1992; 130: 2549-2556.

Di Carlo R, Meli R, Galdiero M, Nuzzo I, Bentivoglio C, Carratelli CR. Prolactin protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. Life Sci. 1993; 53: 981-989.

Dias JCP, Borges Dias, R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. Ciência e Cultura. 1979; 31:105-124. .

Dias JCP. Natural history of Chagas' disease. Arq Bras Cardiol. 1995; 65: 359-366.

Dias JC, Amato Neto V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44 (2): 68-72.

D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Eur J Immunol. 1985; 15(2): 201-203.

D'Imperio Lima M, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J Immunol. 1986; 137: 353-356.

Dinarello CA, Mier JW. Lymphokines. N Engl J Med. 1987; 317(15): 940-945.

Ding A, Hwang S, Lander HM, Xie QW. Macrophages derived from C3H/HeJ (Lpsd) mice respond to bacterial lipopolysaccharide by activating NF-kappa B. J Leukoc Biol. 1995; 57(1): 174-179.

Dimitrov S, Lange T, Fehm HL, Born J. A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. Brain Behav Immun. 2004; 18(4): 368-374.

Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. Endocr Rev. 2000; 21: 292-312.

dos Santos PV, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. Microbes Infect. 2001; 3(12): 971-984.

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.

DosReis GA, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LV, Lopes MF. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 97-105.

DosReis GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi,* the etiological agent of Chagas disease. Braz J Med Biol Res. 2011; 44(2): 84-90.

Duncan MJ, Goldman BD. Physiological doses of prolactin stimulate pelage pigmentation in Djungarian hamster. Am J Physiol. 1985; 248: 664-667.

Duncan GS, Mittrücker HW, Kägi D, Matsuyama T, Mak TW. The transcription factor interferon regulatory factor-1 is essential for natural killer cell function in vivo. J Exp Med. 1996; 184(5): 2043-2048.

Duthie MS, Wleklinski-Lee M, Smith S, Nakayama T, Taniguchi M, Kahn SJ. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T Cells limit parasitemia and augment the antibody response to a Glycophosphoinositol-modified surface protein. Infect Immun. 2002; 70(1): 36-48.

Duthie MS, Kahn M, White M, Kapur RP, Kahn SJ. Both CD1d Antigen presentation and interleukin-12 are required to activate Natural Killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun. 2005; 73(3): 1890-1894.

Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Curr Opin Infect Dis. 2008; 21(3): 287-292.

Dzitko K, Malicki S, Komorowski J. Effect of hyperprolactinaemia on *Toxoplasma gondii* prevalence in humans. Parasitol Res. 2008; 102(4):723-729.

Dzitko K, Gatkowska J, Płociński P, Dziadek B, Długońska H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. Parasitol Res. 2010; 107(1): 199-204.

Dzitko K, Lawnicka H, Gatkowska J, Dziadek B, Komorowski J, Długońska H. Inhibitory effect of prolactin on *Toxoplasma* proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. Parasite Immunol. 2012; 34(6): 302-311.

Eberl G, MacDonald HR. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. Eur J Immunol. 2000; 30(4): 985-992.

Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions.Annu Rev Immunol. 1996;14:155-177.

Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop. 2002; 81(2):123-132.

Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of

posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(1): 174-179.

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

Filipin Mdel V, Caetano LC, Brazão V, Santello FH, Toldo MP, do Prado JC Jr. DHEA and testosterone therapies in *Trypanosoma cruzi*-infected rats are associated with thymic changes. Res Vet Sci. 2010; 89(1): 98-103.

Filipin Mdel V, Brazão V, Santello FH, Caetano LC, Toldo MP, do Prado JC Jr. Prolactin: Does it exert an up-modulation of the immune response in *Trypanosoma cruzi*-infected rats? Vet Parasitol. 2011; 181 (2-4):139-145.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 1991; 147(11): 3815-3822.

Fitzgerald P, Dinan TG. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. Journal of Psychopharmacology. 2008; 22: 12-19.

Fletcher-Chiappini SE, Compton MM, La Voie HA, Day EB, Witorsch RJ. Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb2 lymphoma cells: antiproliferative versus anticytolytic effects. Proc Soc Exp Biol Med. 1993; 202: 345-352.

Flora Filho R., Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras. 2000; 46(3): 265-271.

Fraser IS, Zhuang GL. Polymers of prolactin and their clinical significance. Obstet Gynecol Surv. 1990; 45(8): 515-520.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiological Reviews. 2000; 80: 1523-1631.

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. Nature. 2000; 403(6766): 199-203.

Frosch S, Küntzlin D, Fleischer B. Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity. Infect Immun. 1997; 65(3): 971-977.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop. 2010; 115 (1-2): 22-27.

Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. J Immunol. 1993; 150(12): 5673-5681.

Gala RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. Proc Soc Exp Biol Med. 1991; 198: 513-527.

Gala RR, Shevach EM. Identification by analytical flow cytometry of prolactin receptors on immunocompetent cell populations in the mouse. Endocrinology. 1993; 133: 1617.

Galvão da Silva AP, de Almeida Abrahamsohn I. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology. 2001; 104(3): 349-354.

Garcia SB, Paula JS, Giovannetti GS, Zenha F, Ramalho EM, Zucoloto S, Silva JS, Cunha FQ. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol. 1999; 93(4): 191-197.

Garcia ES, Genta FA, De Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2010; 26(10): 499-505.

Gattass CR, Lima MT, Nóbrega AF, Barcinski MA, Dos Reis GA. Do self-heart-reactive T cells expand in *Trypanosoma cruzi*-immune hosts? Infect Immun. 1988; 56(5):1402-1405.

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

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 inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. Eur J Immunol. 1992; 22: 2501–2506.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 6115-6119.

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nat Rev Immunol. 2006; 6(12): 895-906.

Gerlo S, Verdood P, Hooghe-Peters EL, Kooijman R. Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. J Neuroimmunol. 2005; 162(1-2): 190-193.

Gingras MC, Margolin JF. Differential expression of multiple unexpected genes during U937 cell and macrophage differentiation detected by suppressive subtractive hybridization. Exp Hematol. 2000; 28(1): 65-76. Erratum in Exp Hematol. 2000; 28(3): 347.

Girolomoni G, Phillips JT, Bergstresser PR. Prolactin stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol. 1993; 101: 275-279.

Glasow A, Breidert M, Haidan A, Anderegg U, Kelly PA, Bornstein S. Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81: 3103-3111.

Glezer A. Estudo da atividade biológica da macroprolactina humana em células Nb2 e em células Ba/F-03 tranfectadas com o receptor da prolactina humano forma longa. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2005.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. Immunol Today. 2000; 21(11): 573-583.

Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. Annu Rev Physiol. 2002; 64: 47-67.

Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(1): 115–121.

Grauert MR, Houdayer M, Hontebeyrie-Joskowciz M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. Clin Exp Immunol. 1993; 93(1): 85-92.

Gray EE, Cyster JG. Lymph Node Macrophages. J Innate Immun. 2012; 4(5-6): 424-436.

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

Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol. 1995; 57: 707-736.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-667

Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Infect Dis. 2008; 197(10): 1468-1476.

Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(1): 236-245.

Hamosh M, Hamosh P. The effect of prolactin on the lecithin content of fetal rabbit lung. J Clin Invest. 1977; 59: 1002-1005.

Higuchi K, Nawata H, Maki T, Higashizima M, Kato K, Ibayashi H. Prolactin has a direct effect on adrenal androgen secretion. J Clin Endocrinol Metab. 1984; 59: 714-718.

Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1993; 423(3):157-160.

Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1993; 151(12): 7038-7047.

Hoft DF, Eickhoff CS. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. Infect Immun. 2002; 70(12): 6715-6725.

Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. Infect Immun. 1998; 66(3): 1208-1215.

Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. Infect Immun. 2000; 68(7): 4075-4083.

Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. EMBO J. 1997; 16(23): 6926-6935.

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

Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. Infect Immun. 1996; 64(7): 2381-2386.

Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grünig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi.* J Immunol. 1997; 158(7): 3311-3316.

Hyland KV, Engman DM. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. Trends Parasitol. 2006; 22(3): 101-102.

Hwang P, Guyda H, Friesen H. A radioimmunoassay for human prolactin. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1971; 68: 1902-1906.

Hwang P, Guyda H, Friesen H. Purification of human prolactin. The Journal of Biological Chemistry. 1972; 247: 1955-1958.

Imada K, Bloom ET, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono JA, Udy GB, Davey HW, Leonard WJ. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. J Exp Med. 1998; 188(11): 2067-2074.

Janeway CA Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(13): 7461-7468.

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

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. Nature. 2003; 421(6925): 852-856.

Johnson JW, Tyson JE, Mitzner W, Beck JC, Andreassen B, London WT, Villar J. Amniotic fluid prolactin and fetal lung maturation. Am J Obstet Gynecol. 1985; 153: 372-380.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48(3): 348-357.

Josimovich JB, Merisko K, Boccella L. Amniotic prolactin control over amniotic and fetal extracellular fluid water and electrolytes in the rhesus monkey. Endocrinology. 1977; 100: 564-570.

Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? Parasitol Today. 1996; 12(10): 396-399.

Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 2010; 12(7): 511-517.

Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME. The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. J Mol Biol. 2003; 328(5): 1105-1121.

Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben Jonathan N, Grandy DK, Low MJ. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. Neuron. 1997; 19: 103-113.

Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(2):210-223.

Kierszenbaum F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? Trends Parasitol. 2005; 21(11): 513-516.

Kiertscher SM, Roth MD. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. J Leukoc Biol. 1996; 59(2): 208-218.

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

Köberle F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. Bull World Health Organ. 1970; 42(5):739-743.

Kooijman R, Gerlo S, Coppens A, Hooghe-Peters EL. Growth hormone and prolactin expression in the immune system. Ann NY Acad Sci. 2000; 917: 534-540.

Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. Endocrinology. 2003; 144(5): 2102-2110.

Kumar A, Singh SM, Sodhi A. Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal macrophages: role of Ca^{2+} and protein kinase C. Int J Immunopharmacol. 1997; 19(3): 129-133.

Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 1998; 20(5): 207-216.

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

Lannes-Vieira J, Pereira IR, Vinagre NF, Arnez LE. TNF-a and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. Adv Exp Med Biol. 2011; 691: 221-30.

Laucella SA, Rottenberg ME, de Titto EH. Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. Rev Argent Microbiol. 1996; 28(2): 99-109.

LaVoie HA, Witorsch RJ. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1995; 209: 257-269.

Leaños-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2001; 86: 2619-2624.

Lebrun JJ., Ali S, Sofer L, Ullrich A, Kelly P A. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK-2. J Biol Chem. 1994; 269(19): 14021-14026.

Ledesma-Soto Y, Blanco-Favela F, Fuentes-Pananá EM, Tesoro-Cruz E, Hernández-González R, Arriaga-Pizano L, Legorreta-Haquet MV, Montoya-Diaz E, Chávez-Sánchez L, Castro-Mussot ME, Chávez-Rueda AK. Increased levels of prolactin receptor expression correlate with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional-1 B cells after prolactin treatment. BMC Immunol. 2012; 13:11.

Lee SC, Zhao ML, Hirano A, Dickson DW. Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. J Neuropathol Exp Neurol. 1999; 58:1163-1169.

Lee J, Majumder S, Chatterjee S, Muralidhar K. Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. J Biosci. 2011; 36(2): 341-354.

Leff MA, Buckley DJ, Krumenacker JS, Reed JC, Miyashita T, Buckley AR. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. Endocrinology. 1996; 137(12): 5456-5462.

Leite De Moraes MC, Touraine P, Gagnerault MC, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. Prolactin receptors and the immune system. Annales d'endocrinologie. 1995; 56: 567-570.

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

Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. Front Biosci. 2003; 8:e315-322.

Lepletier A, de Frias Carvalho V, Morrot A, Savino W. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones. Ann N Y Acad Sci. 2012; 1262: 45-50.

Lewis UJ, Singh RN, Seavey BK. Human prolactin: isolation and some properties. Biochemical and biophysical research communications. 1971; 44: 1169-1176.

Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca^{2+} mobilization, and enzyme release. J Immunol. 1996; 156(1): 322-327.

Lopes MF, Veiga VF, Santos AR, Fonseca MEF, DosReis GA. Activation-induced $CD4^{+}$ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. J. Immunol. 1995; 154: 744-752.

López-Meza JE, Lara-Zárate L, Ochoa-Zarzosa A. Effects of Prolactin on Innate Immunity of Infectious Diseases. The Open Neuroendocrinology Journal. 2010; 3: 175-179.

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

Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol Today. 1998; 14(3): 119-124.

Machado FS, Tyler KM, Brant F, Esper L, Teixeira MM, Tanowitz HB. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. Front Biosci (Elite Ed). 2012a; 4: 1743-1758.

Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. Semin Immunopathol. 2012b; 34(6): 753-770.

Mainoya Jr. Further studies on the action of prolactin on fluid and ion absorption by the rat jejunum. Endocrinology. 1975; 96: 1158-1164.

Manoel-Caetano FS, Silva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cad Saude Publica. 2007; 23: 2263-2274.

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.

Marcipar IS, Welchen E, Roodveldt C, Marcipar AJ, Silber AM. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. FEMS Microbiol Lett. 2003; 220(1): 149-154.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation. 2007; 115(9): 1109-1123.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Maciel BC, Simoes MV, Schmidt A. Chagas heart disease. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ. Evidence-based cardiology. London: BMJ Books; 2010. p. 823-841.

Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell. 1987; 51: 813-819.

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

Martin DL, Tarleton RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2005; 174(3): 1594-1601.

Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, Heiges M, Craven SH, Rosenberg CS, Collins MH, Sette A, Postan M, Tarleton RL. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. PLoS Pathog. 2006; 2(8): e77.

Martini AS, Lopes RA, Utrilla LS, Ribeiro RD, Reis CC. Morphological and morphometric study of the alterations on young mouse parotid gland with subpatent Chagas' disease. Angew Parasitol. 1986; 27(2): 65-72.

Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, Rizzo LV, Silva JS. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 2004; 6(13):1133-1144.

Matalka KZ. Prolactin enhances production of interferon-gamma, interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor-alpha, in a stimulus-specific manner. Cytokine. 2003; 21(4): 187-194.

Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. Brain, Behavior and Immunity. 1992; 6: 409-417.

Matera L, Bellone G, Lebren JJ, Kelly PA, Hooghe Peters EL, Di Celle PF, Foa R, Contarini M, Avanzi G, Asnaghi V. Role of prolactin in the in vitro development of interleukin-2-driven anti-tumoural lymphokine-activated killer cells. Immunology. 1996; 89(4): 619-626.

Matera L. Action of pituitary and lymphocyte Prolactin. Neuroimmunomodulation. 1997; 4: 171-180.

Matera L, Contarini M, Bellone G, Forno B, Biglino A. Up-modulation of interferon-gamma mediates the enhancement of spontanous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer cells. Immunology. 1999; 98(3): 386-392.

Matera L, Galetto A, Geuna M, Vekemans K, Ricotti E, Contarini M, Moro F, Basso G. Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum-free conditions. Immunology. 2000; 100(1): 29-36.

Matera L, Mori M. Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. Ann N Y Acad Sci. 2000; 917: 505-513.

Matera L, Mori M, Galetto A. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. Lupus. 2001; 10: 728-734.

Matera L, Buttiglieri S, Moro F, Geuna M. Effect of prolactin on natural killer and MHC-restricted cytotoxic cells. Growth and Lactogenic Hormones. 2002; 2; 205-218.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis. 2007; 1 (2): e114.

Matsuda NM, Miller SM, Evora PR. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. Sao Paulo: Clinics; 2009. 64(12): 1219e24.

Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends Biochem Sci. 1997; 22(12): 477-481. Erratum in Trends Biochem Sci 1998; 23(2): 87.

McMurray RW. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. International Immunopharmacology. 2001; 1: 995-1008.

Meli R, Raso GM, Bentivoglio C, Nuzzo I, Galdiero M, Di Carlo R. Recombinant human prolactin induces protection against *Salmonella typhimurium* infection in the mouse: role of nitric oxide. Immunopharmacology. 1996; 34(1): 1-7.

Meli R, Raso GM, Gualillo O, Pacilio M, Di Carlo R. Prolactin modulation of nitric oxide and TNF-alpha production by peripheral neutrophils in rats. Life Sciences. 1997; 61: 1395-1403.

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

Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 2001; 159(5): 1723-1733.

Minoprio P, Bandeira A, Pereira P, Mota Santos T, Coutinho A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. Int Immunol. 1989; 1(2):176-184.

Minoprio P, el Cheikh MC, Murphy E, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coffman R, Coutinho A, O'Garra A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. J Immunol. 1993; 151(8): 4200-4208.

Minoprio P. Impact of polyclonal lymphocyte responses on parasite evasion and persistence. In: Kelly JM, ed. Molecular mechanisms of Chagas disease pathogenesis. Eureka; 2002.

Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R, Okumura K, Yagita H, Aoki T. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun. 2003; 71(6): 3131-3137.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991; 43(2): 109-142.

Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. Handb Exp Pharmacol. 2006; (176 Pt 1): 213-54.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 2006; 100: 663-677.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 17-30.

Montalvão F, Almeida GM, Silva EM, Borges VM, Vasconcellos R, Takiya CM, Lopes MF, Nunes MP, DosReis GA. Apoptotic lymphocytes treated with IgG from *Trypanosoma cruzi* infection increase TNF-alpha secretion and reduce parasite replication in macrophages. Eur J Immunol. 2010; 40(2): 417-425.

Montes de Oca P, Macotela Y, Nava G, López-Barrera F, de la Escalera GM, Clapp C. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. Lab Invest. 2005; 85(5): 633-642.

Mora JR. Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. Inflamm Bowel Dis. 2008; 14(2): 275-289.

Moro M, Inada Y, Miyata H, Komatsu H, Kojima M, Tsujii H. Effects of dopamine d2 receptor agonists in a pituitary transplantation-induced hyperprolactinaemia/anovulation model in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2001; 28: 651-658.

Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Tokumitsu H, Inuzuka H, Wong NC, Shupnik MA, Kobayashi R, Ishida T. Role of calcium-calmodulin-dependent protein kinase cascade in thyrotropin (TSH)-releasing hormone induction of TSH and prolactin gene expression. Endocrinology. 2004; 145: 4846-4852.

Müller U, Köhler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, Brombacher F, Hölscher C. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. J Immunol. 2001; 167(6): 3346-3353.

Nagy E, Berczi I. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. Acta Endocrinol (copenh). 1978; 89(3): 530-537.

Nagy E, Berczi I. Pituitary dependence of bone marrow function. Br J Haematol. 1989; 71: 457-462.

Nagy E, Berczi I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. Endocrinology. 1991; 128 (6): 2776-2784.

Nanbu-Wakao R, Fujitani Y, Masuho Y, Muramatsu M, Wakao H. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. Mol Endocrinol. 2000; 14: 307-316.

Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol. 1991; 3(1): 65-70.

Nickell SP, Keane M, So M. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4+ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. Infect Immun. 1993; 61(8): 3250-3258.

Nickell SP, Sharma D. *Trypanosoma cruzi:* roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. Exp Parasitol. 2000; 94(4): 207-216.

Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF, DosReis GA. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts.J Immunol. 1998; 160(3): 1313-1319.

Nuñez-Apaza LN. Avaliação fenotípica funcional e dos requerimentos para a geração dos linfócitos T $CD8^{low}$ $CD45RC^{low}$ no camundongo com infecção crônica por *Trypanosoma cruzi*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008.

Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schüler M, Biskup C, Schedlowski M, Nast-Kolb D, Exton MS. Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice. J Surg Res. 2003; 113(2): 248-256.

Oberholtzer E, Contarini M, Veglia F, Cossarizza A, Franceschi C, Geuna M, Provinciali M, Di Stefano G, Sissom J, Brizzi MF, Pegoraro L, Matera L. Prolactin increases the susceptibility of primary leukemia cells to NK and LAK effectors. Adv Neuroimmunol. 1996; 6: 233-247.

O'Neal KD, Yu-Lee LY. The proline-rich motif (PRM): a novel feature of the cytokine/hematopoietin receptor superfamily. Lymphokine Cytokine Res. 1993; 12(5): 309-312.

Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. Autoimmunity Reviews. 2007; 6: 537-542.

Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. Science. 1981; 212: 815-816.

Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silvério JC, Gibaldi D, Pyrrho Ados S, Benjamim CF, Lannes-Vieira J, Bozza MT. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. J Leukoc Biol. 2009; 86(5): 1239-1246.

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.

Park S, Kang S, Lee HW, Ko BS. Central prolactin modulates insulin sensitivity and insulin secretion in diabetic rats. Neuroendocrinology. 2012; 95(4): 332-343.

Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. Dermatol Clin. 2011 Jan; 29(1): 53-62.

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

Pearson RD. Chagas cardiomyopathy (*Trypanosoma cruzi*): does prolactin play a role?. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2007; 18: 209.

Peeva E, Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. Immunology Letters. 2005; 101: 123-143.

Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. Molecular Endocrinology. 1992; 6: 1023-1031.

Pellegrini A, Guiñazu N, Giordanengo L, Cano RC, Gea S. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. Future Microbiol. 2011; 6(12):1521-1533.

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

Petty RG. Prolactin and antipsychotic medications: mechanism of action. Schizophr Res. 1999; 35: S67-S73

Piccoletti R, Maroni P, Bendinelli P, Bernelli-Zazzera A. Rapid stimulation of mitogen-activated protein kinase of rat liver by prolactin. Biochem J. 1994; 303: 429-433.

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

Pletinckx K, Döhler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. Front Immunol. 2011; 2: 39.

Posner BI, Kelly PA, Friesen HG. Prolactin receptors in rat liver: possible induction by prolactin. Science. 1975; 188: 57-59.

Powers CA, Hatala MA. Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: in vitro reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin in vitro. Endocrinology. 1990; 127: 1916-1927.

Prado JC Jr, Levy AM, Leal MP, Bernard E, Kloetzel JK. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi.* Parasitol Res. 1999; 85(10): 826-829.

Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 2002; 2: 106-115. Erratum in: Nature Rev Immunol 2002; 2: 215.

Queiroz SL, Batista AA. Biological functions of nitric oxide. Química Nova. 1999; 22(4): 584-590.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem. 1991a; 266(7): 4244-4250.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 1991b; 288(2): 481-487.

Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. Annu Rev Immunol. 2008; 26: 293-316.

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

Rassi A, Rassi A Jr, Rassi SG, et al. Doenca de Chagas. In: Lopes AC, ed. Tratado de clinica medica, (2 ed). Sao Paulo: Editora Roca, 2009. p.4123-4134.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010; 375 (9723): 1388-1402.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci. 2004; 117: 1281-1283.

Reber PM. Prolactin and immunomodulation. Am J Med. 1993; 95(6): 637-644.

Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 1994; 153(7): 3135-3140.

Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. Parasitol Today. 2000; 16: 62-67.

Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. Clin Immunol Immunopathol. 1997; 83(2):165-172.

Rezende-Oliveira K, Sarmento RR, Rodrigues V Jr. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi.* Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(1): 45-50.

Rhodes SJ, diMattia GE, Rosenfeld MG. Transcriptional mechanisms in anterior pituitary cell differentiation. Curr Opin Genet Dev. 1994; 4: 709-717.

Ribeiro SP. Análise da imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando epitopos CD4 promíscuos e conservados do HIV-1 em camundongos BALB/c e transgênicos para moléculas de HLA classe II. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Alergia e Imunopatologia; 2010.

Richardson BP. Evidence for a physiological role of prolactin in osmoregulation in the rat after its inhibition by 2-bromo-aergokryptine. Br J Pharmacol. 1973; 47: 623P-624P.

Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. The preparation, identification and assay of prolactin-a hormone of anterior pituitary. Am J Physiol. 1933; 105: 191-216.

Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S Jr, Rodrigues V Jr. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. Clin Dev Immunol. 2012; 2012: 361730.

Robertson MT, Boyajian MJ, Patterson K, Robertson WV. Modulation of the chloride concentration of human sweat by prolactin. Endocrinology.1986; 119: 2439-2444.

Rodrigues AA, Saosa JS, da Silva GK, Martins FA, da Silva AA, Souza Neto CP, Horta CV, Zamboni DS, da Silva JS, Ferro EA, da Silva CV. IFN-γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(4): e1598.

Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, Serra E, Revelli S, Bottasso O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. Clin Exp Immunol. 2002; 128(3): 421-428.

Roggero E, Piazzon I, Nepomnaschy I, Perez A, Velikovsky A, Revelli S, Bottasso O. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004; 41(2): 123-131.

Roggero E, Pérez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, Bottasso AO, Del Rey A. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection**.** The Journal of Endocrinology. 2006; 190: 495-503.

Rooijiman R, Hooghe-Peters EL, Hooghe R. Prolactin growth hormone, and insulin-like growth factor-1 in the immune system. Adv Immunol. 1996; 63: 377- 454.

Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. J Immunol. 1988; 141: 1665-1669.

Rottenberg ME, Castaños-Velez E, de Mesquita R, Laguardia OG, Biberfeld P, Orn A. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. Eur J Immunol. 1996; 26(12): 3203-3213.

Rui H, Djeu J Y, Evans G A, Kelly P A, Farrar W L. Prolactin receptor triggering. Evidence for rapid tyrosine kinase activation. J. Biol. Chem. 1992; 267(33): 24076-24081.

Ryníková A, Koppel J, Kuchár S, Cikos S, Mozes S. Effects of ovine prolactin in infant rats. Exp Clin Endocrinol. 1988; 92: 241-244.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nature Immunology. 2002; 3: 1041-1047.

Sansom DM, Walker LS. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. Immunol Rev. 2006; 212: 131-148.

Santello FH, Del Vecchio Filipin M, Caetano LC, Brazão V, Caetano LN, Dos Santos CD, Alonso Toldo MP, do Prado JC Jr. Influence of melatonin therapy and orchiectomy on T cell subsets in male Wistar rats infected with *Trypanosoma cruzi*. J Pineal Res. 2009; 47(3): 271-276.

Santello FH, Caetano LC, Filipin Mdel V, Brazão V, Caetano LN, Toldo MP, do Prado JC Jr. Does orchiectomy enhance the immune-stimulatory effects of melatonin during experimental Chagas' disease? Res Vet Sci. 2012; 93(2): 819-825.

Santos-Buch CA, Teixeira AR. The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. J Exp Med. 1974; 140(1): 38-53.

Santos CD, Toldo MP, Levy AM, Prado JC Jr. *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in Calomys callosus a natural reservoir of infection. Exp Parasitol. 2008; 119(2): 197-201.

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

Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. Science. 1990; 248(4961): 1349-1356.

Schwartz RH. T cell anergy. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 305-334.

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

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol. 2002; 2(2):116-126.

Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1): 93-101.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(1): 75-85.

Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2012; 11(6-7): A465-470.

Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folha Clínica Biol. 1953; 20: 191-201.

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). J Exp Med. 1991; 174: 539-545.

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1992; 175(1): 169-174.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. Infect Immun. 1995; 63(12): 4862-4867.

Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Pádua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res. 1998; 31(1): 111-15.

Silva JS, Machado FS, Martins GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front Biosci. 2003; 8: s314-325.

Silva EM, Guillermo LV, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Nunes MP, Senra JF, Soares MB, DosReis GA, Lopes MF. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. Eur J Immunol. 2007; 37(3): 738-746.

Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. PLoS Pathog. 2012; 8(4): e1002645.

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

Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An Acad Bras Cienc. 2001; 73(4): 547-559

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

Sodhi A, Tripathi A. Prolactin induced production of cytokines in macrophages involves Ca++ and p42/44 MAP kinase signaling pathway. Growth Factors. 2008a; 26(4): 212-219.

Sodhi A, Tripathi A. Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages *in vitro*: involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF-kappa B. Cytokine. 2008b; 41(2): 162-73.

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: 395-398.

Sorenson RL, Brelje TC, Hegre OD, Marshall S, Anaya P, Sheridan JD. Prolactin (*in vitro*) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet b cells. Endocrinology. 1987; 121: 1447-1453.

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

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 1994; 76: 301-314.

Stricker P, Grueter R. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. C R Seances Soc Biol Fil. 1928; 99: 1978-1980.

Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. Sensors. 2003; 3: 276-284.

Tafuri WL. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American Trypanosomiasis. Virchows Arch. 1971; 354:136-149

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 335-376.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi.* Microbes Infect. 2000; 2: 851-866.

Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis. 2004; 38(7): 943-950.

Tan JK, O'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. J Leukoc Biol. 2005; 78(2): 319-324.

Taniwaki NN, Gonçalves VM, Romero JK, Da Silva CV, Da Silva S, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi* strains in the *Calomys callosus*: parasitemia and reaction of intracellular forms with stage-specific antibodies in the acute and chronic phase of infection and after immunosuppression. Parasitol Res. 2011; 109(2): 431-440.

Tarleton RL. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. Parasitol Today. 1995; 11(1): 7-9.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol. 2007; 19(4): 430-434.

Teilum K, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB. Solution structure of human prolactin. J Mol Biol. 2005; 351(4): 810-823.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol. 2002; 18: 262-265.

Terenzi F, Diaz-Guerra MJ, Casado M, Hortelano S, Leoni S, Bosca L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. J Biol Chem. 1995; 270: 6017-6021.

Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? Cell. 1995; 81(7): 979-982.

Tomio A, Schust DJ, Kawana K, Yasugi T, Kawana Y, Mahalingaiah S, Fujii T, Taketani Y. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. Immunol Cell Biol. 2008; 86: 616-621.

Torrico F, Heremans H, Rivera 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: 3626-3632.

Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70: 201-209.

Tostes Júnior S, Lopes ER, Pereira FE, Chapadeiro E. Human chronic chagasic myocarditis: quantitative study of $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes in inflammatory exudates. Rev Soc Bras Med Trop. 1994; 27: 127-134.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. Nat Rev Immunol. 2007; 7(3): 179-190.

Tripathi A, Sodhi A. Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with prolactin and growth hormone: involvement of protein tyrosine kinases, Ca(++), and MAP kinase signal transduction pathways. Mol Immunol. 2007; 44: 3185-3194.

Tripathi A, Sodhi A. Prolactin-induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAPK pathways. Int Immunol. 2008; 20(3): 327-336.

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

Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. Isolation and characterization of the human prolactin gene. EMBO J. 1984; 3: 429-437.

Truyens C, Torrico F, Angelo-Barrios A, Lucas R, Heremans H, De Baetselier P, Carlier Y. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. Parasite Immunol. 1995; 17(11): 561-568.

Tsunoda I, Lane TE, Blackett J, Fujinami RS. Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10. Mult Scler. 2004; 10: 26-34.

Ueda EKM. Prolactina humana pseudofosforilada (S179D-hPRL) é um potente fator anti-angiogênico *in vitro* e *in vivo*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Comissão Nacional de Energia Nuclear; 2006.

Une C, Andersson J, Orn A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi.* Clin Exp Immunol. 2003; 134(2): 195-201.

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

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet. 1996; 348(9031): 891-892.

Vago AR, Silva DM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, d'Avila Reis D. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaoesophagus. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97(3): 308-309.

Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. Immunol Rev. 1996; 153: 47-83.

Vinhaes MC, Dias JC. Chagas disease in Brazil. Cad Saúde Publica. 2000; 16: 7-12.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun. 1994; 62(11): 5177-5182.

Villablanca EJ, Russo V, Mora JR. Dendritic cell migration and lymphocyte homing imprinting. Histol Histopathol. 2008; 23(7): 897-910.

Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. Infect Immun 1998; 66:4690-4695.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating $CD3^{+}CD16^{-}$ $CD56^{+}$ natural killer T cells and $CD4^{+}CD25^{High}$ regulatory T lymphocytes. Scand J Immunol. 2005; 62(3): 297-308.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and $CD4^{+}CD25^{High}$ T cells balancing activated $CD8^{+}$ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? Clin Exp Immunol. 2006; 145: 81-92.

Viveros-Paredes JM, Puebla-Pérez AM, Gutiérrez-Coronado O, Sandoval-Ramírez L, Villaseñor-García MM. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. International Immunopharmacology. 2006; 6: 774-781.

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

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*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2007; 118: 199-209.

Weigent DA. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. Pharmacol Ther. 1996; 69(3): 237-257.

WHO. World Health Organization. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series n°. 905, Geneva. 2002; 96 pp.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet n°. 340. Wkly Epidemiol Rec. 2010; 85(34): 334-36.
Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html

Witorsch RJ, Day EB, LaVoie HA, Hashemi N, Taylor JK. Comparison of glucocorticoid-induced effects in prolactin-dependent and autonomous rat Nb2 lymphoma cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1993; 203: 454-446.

Wu H, Devi R, Malarkey WB. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. Endocrinology. 1996; 137(1): 349-353.

Xu D, Lin L, Lin X, Huang Z, Lei Z. Immunoregulation of autocrine prolactin: Suppressing the expression of costimulatory molecules and cytokines in T lymphocytes by prolactin receptor knockdown. Cell Immunol. 2010; 263(1): 71-78.

Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. Science. 1996; 273(5283): 1862-1864.

Yazigi RA, Quintero CH, Salameh WA. Prolactin disorders. Fertil Steril. 1997; 67: 215-225.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1):101-107.

Yu-Lee Ly, Hrachovy JA, Stevens AM, Schwarz LA. Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells. Mol Cell Biol. 1990; 10: 3087-3094.

Yu-Lee LY. Molecular actions of prolactin in the immune system. Proc Soc Exp Biol Med. 1997; 215: 35-52.

Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. Recent Prog Horm Res. 2002; 57: 435-455.

Zeledon R, Rabinovich JE. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu Rev Entomol. 1981; 26: 101-133.

Zellweger R, Zhu XH, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Prolactin administration following hemorrhagic shock improves macrophage cytokine release capacity and decreases mortality from subsequent sepsis. J Immunol. 1996; 157(12):5748-5754.

Zhang J, Andrade ZA, Yu ZX, Andrade SG, Takeda K, Sadirgursky M, Ferrans VJ. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. J Mol Cell Cardiol. 1999; 31(3): 581-596.

Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(3): e648.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

1934 | 2009 USP 75 ANOS

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.279.53.6), intitulado: "Prolactina e suas Ações Imunomoduladoras Durante a Doença de Chagas Experimental", de autoria de **Marina Del Vecchio Filipim** e de **José Clóvis do Prado Junior,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/05/2009.

Ribeirão Preto, 7 de maio de 2009

Presidente da CEUA em exercício
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964