UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Meloxicam e melatonina: teriam uma ação sinérgica
durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*?**

Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira

-RIBEIRÃO PRETO-

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Meloxicam e melatonina: teriam uma ação sinérgica
durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*?**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientado: Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

-RIBEIRÃO PRETO-

2009

OLIVEIRA, L.G.R.

Meloxicam e melatonina: teriam uma ação sinérgica
durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*?

MESTRADO

FCFRP-USP

2009

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.

Oliveira, Luiz Gustavo Rodrigues

Meloxicam e melatonina: teriam uma ação sinérgica durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*? Ribeirão Preto 2009.

80p.: Il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prado Junior, José Clóvis

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Melatonina. 3. Meloxicam. 4. Citocinas. 5. Prostaglandinas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira

Meloxicam e melatonina: teriam uma ação sinérgica durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*?

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus..

Pela saúde e por todas as graças concebidas

*Aos meus pais Vicente de Paulo Oliveira e Maria das Graças Rodrigues Oliveira
por ensinar a honestidade e dignidade, oferecendo sempre amor e carinho
incondicionais.*

*Ao meu irmão Douglas Rodrigues Oliveira, exemplo de amizade, caráter e
determinação o qual tento me espelhar.*

*Ao meu irmão Fábio Rodrigues Oliveira por ser sempre o meu melhor amigo em
todos os momentos, meu exemplo de força e coragem.*

*A minha sobrinha Ana Beatriz Gomes Oliveira por transmitir toda a alegria
pura e ingênua de criança que nos torna mais felizes.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Aos amigos Christian Collins Kuehn, Carla Domingues dos Santos Sponchiado, Mariana Rosa da Silva, Kelly Cristina Rodrigues, Mariana Bryan Augusto que compartilham todas as experiências positivas ou negativas no laboratório, sempre ajudando e incentivando.

Às amigas: Maria Angelina Lázaro Castilho, Josiane Aparecida Gabriel Bevilacqua e Analuiza Souza Costa que participaram de maneira fundamental na conclusão deste importante passo de minha vida.

Aos amigos Danilo Candido de Almeida e professor Antonio Sousa Santos pelo importante apoio e atenção dispensados a mim.

Aos docentes de parasitologia da FCFRP-USP Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque e Prof. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão.

Aos técnicos de laboratório de parasitologia, Míriam Paula Alonso Toldo, Antônia Ferreira Cruz e Georgius Luiz de Oliveira pela ajuda fundamental e amizade.

Às funcionárias da FCFRP-USP Maraísa Palhão Véri, Regina de Albuquerque, Vânia Cláudia de Albuquerque e Wânia Maria Tavares da Silva.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto e Laura M. Kawasse, do laboratório de Patologia da FMRP-USP, pela colaboração na confecção das lâminas histológicas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado e concessão do auxílio financeiro para execução deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram de maneira direta ou indireta para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vi
1- Introdução	1
1.1- Doença Chagas	1
1.2- Imunologia da Doença de Chagas	2
1.3- Prostaglandinas, Citocinas e Inibidores de (COX)	4
1.4- Melatonina e o Sistema Imune	5
2 - Objetivos do projeto	7
2.1 - Objetivo complementar	7
3 - Justificativa	8
4. Materiais e Métodos	9
4.1 - Animais e infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
4.1.2 - Infecção pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
4.1.3 - Grupos experimentais	10
4.2 - Drogas e protocolo de tratamento	11
4.3 - Eutanásia dos animais	12
4.4 - Parasitemia	12
4.5 - Quantificação de Nitrito	13

4.6 - Quantificação de Prostaglandina E ₂	14
4.7 - Ensaio de Citocinas do grupo Th-1 e Th-2.....	15
4.8 - Técnica histológica e intensidade do parasitismo tecidual.....	16
4.9 - Análises Estatísticas.....	16
5. Resultados.....	17
5.1 - Parasitemia durante o curso da infecção aguda.....	17
5.2 - Produção de PGE ₂ por células peritoneais de todos os animais utilizados no estudo.....	19
5.2.1 - Níveis de PGE ₂ durante o curso da infecção aguda.....	20
5.3 - Níveis de IL-2 nos soros de todos os animais utilizados no estudo.....	21
5.3.1 - Níveis de IL-2 durante o curso da infecção aguda.....	22
5.4 - Níveis de TNF-α nos soros de todos os animais utilizados no estudo.....	23
5.4.1 - Níveis de TNF-α durante o curso da infecção aguda.....	24
5.5 - Níveis de INF-γ nos soros de todos os animais utilizados no estudo.....	25
5.5.1 - Níveis de INF-γ durante o curso da infecção aguda.....	26
5.6 - Produção de Nitrito por células peritoneais de todos os animais utilizados no estudo.....	27
5.7 - Níveis de IL-4 nos soros de todos os animais utilizados no estudo.....	29

5.7.1 - Níveis de IL-4 durante o curso da infecção aguda.....	30
5.8 - Níveis de IL-10 nos soros de todos os animais utilizados no estudo.....	31
5.8.1 - Níveis de IL-10 durante o curso da infecção aguda.....	32
5.9 - Parasitismo Tecidual do Coração.....	33
5.10 - Histopatologia do Coração (14º dia).....	34
5.10.1 - Grupos não infectados: Tratados ou não pelos diferentes esquemas terapêuticos.....	34
5.10.2 - Grupos infectados: Tratados ou não pelos diferentes esquemas terapêuticos.....	35
5.11 - Síntese dos resultados obtidos mediante os diferentes tratamentos.....	37
6. Discussão.....	38
7. Conclusão.....	44
8. Cronograma de trabalho.....	45
9. Referências Bibliográficas.....	46
Anexo.....	62

RESUMO

OLIVEIRA, L.G.R. **Meloxicam e melatonina: teriam uma ação sinérgica durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*?** 2009.80f. Dissertação (Mestrado). Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A modulação das respostas imunológicas em modelos experimentais infectados por *Trypanosoma cruzi* tem contribuído de maneira importante nas investigações de novas terapias contra a doença de Chagas. Neste estudo, avaliamos a produção de citocinas Th1 e Th2 relevantes na fase aguda da doença, assim como, níveis de prostaglandina E₂, nitrito, parasitemia sanguínea e parasitemia tecidual cardíaca em ratos *Wistar* machos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Foram investigados nos 7º, 14º e 21º dias de infecção, as citocinas padrão Th1: IL-2, IFN- γ , TNF- α e padrão Th2: IL-4, IL-10. Os parâmetros foram dosados e interpretados após a administração, ou não, de meloxicam, melatonina ou ambos. A administração de melatonina contribuiu na proteção do hospedeiro submetido à infecção experimental por *T. cruzi* devido às ações imunomodulatórias previamente atribuídas a esta substância. O bloqueio da síntese de PGE₂ atribuído à administração de meloxicam e/ou melatonina durante a fase aguda da infecção foi seguido por uma modulação de citocinas pertencentes aos padrões Th-1 e Th-2. Houve um aumento da síntese de citocinas importantes na proteção do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, tais como IFN- γ , IL-2 e NO. Estes efeitos demonstrados no estudo foram benéficos, sendo evidenciados pela diminuição da carga parasitária dos animais experimentais. Os resultados poderão auxiliar a estabelecer mecanismos alternativos de tratamento na infecção chagásica aguda através de um melhor entendimento das respostas imunológicas anti-*T. cruzi*.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*, Citocinas, Melatonina, Meloxicam, Prostaglandinas

ABSTRACT

OLIVEIRA, L.G.R. **Meloxicam and melatonin: did they trigger a synergic action during the acute phase of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*?** 2009.80f. Dissertation (Master). Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The modulation of the immune responses in experimental models infected with *Trypanosoma cruzi* has effectively contributed for the investigations of new therapies used to treat Chagas' disease. In this study, it was evaluated the production of Th1 and Th2 cytokines, which play a role during the acute phase of the disease, as well as prostaglandin E₂ and nitrite, number of blood parasites and cardiac tissue parasitism in male *Wistar* rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. Experiments were performed on 7, 14 and 21 days after infection in which Th1 cytokines such IL-2, IFN- γ , TNF- α were done and Th2 cytokines as IL-4 and IL-10. The parameters were evaluated with/without the administration of meloxicam, melatonin or both. Melatonin contributed for the host's protection in animals experimentally infected with *T. cruzi* through its immunomodulator actions. The blockage of PGE₂ synthesis was attributed to the administration of meloxicam and/or melatonin during the acute phase of infection, followed by a modulation of the Th1 and Th2 cytokines. In this work enhanced levels of IFN- γ , IL-2 and NO were observed. The analysis of these data was beneficial for the host's protection through a reduced number of amastigote nests in heart tissue. These results permit to establish alternative mechanisms to treat the acute chagasic infection through a better understanding of the immune responses against *T. cruzi*.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, Cytokines, Melatonin, Meloxicam, Prostaglandins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos de ação da Melatonina em células do sistema imune via receptor de membrana MT1 - contrabalanceando os efeitos inibitórios da PGE-2 via AMP-c induzindo a síntese de IL-2. Receptor nuclear RZR/ROR – indução direta da síntese de IL-2.....	6
Figura 2	Parasitemia durante o curso da infecção.....	17
Figura 3	Produção de PGE ₂ por células peritoneais de todos os animais utilizados no estudo.....	19
Figura 3A	Níveis de PGE ₂ durante o curso da infecção aguda.....	20
Figura 4	Níveis de IL-2 nos soros de todos os animais utilizados no estudo.....	21
Figura 4A	Níveis de IL-2 durante o curso da infecção aguda.....	22
Figura 5	Níveis de TNF- α nos soros de todos os animais utilizados no estudo..	23
Figura 5A	Níveis de TNF- α durante o curso da infecção aguda.....	24
Figura 6	Níveis de INF- γ nos soros de todos os animais utilizados no estudo..	25
Figura 6A	Níveis de INF- γ durante o curso da infecção aguda.....	26
Figura 7	Produção de Nitrito por células peritoneais de todos os animais utilizados no estudo.....	27
Figura 8	Níveis de IL-4 nos soros de todos os animais utilizados no estudo....	29

Figura 8A	Níveis de IL-4 durante o curso da infecção aguda.....	30
Figura 9	Níveis de IL-10 nos soros de todos os animais utilizados no estudo..	31
Figura 9A	Níveis de IL-10 durante o curso da infecção aguda.....	32
Figura 10	Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos não infectados obtidos no 14 dia de experimento.....	34
Figura 11	Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtidos no 14º dia de experimento.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos experimentais e dias de experimento.....	10
Tabela 2	Produção de Nitrito por Macrófagos Peritoneais de Ratos <i>Wistar</i> Machos Infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	28
Tabela 3	Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Tabela 4	Síntese do balanço dos níveis de Citocinas Th-1, Th-2, NO ₂ ⁻ , PGE ₂ e Parasitemia em relação aos animais infectados controle (IC).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

COX 1– Cíclooxigenase 1

COX 2 – Cíclooxigenase 2

DP – Desvio Padrão

e.p.m – Erro padrão da média

IC – Infectados Controle

IFN γ – Interferon Gama

IL-2 – Interleucina 2

IL-2r – Receptor de Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

I.p. – Intraperitoneal

IT – Infectados tratados

Mel – Melatonina

MT1 – Receptor para melatonina presente em membrana de linfócitos

MT2 – Receptor para melatonina presente em membrana de linfócitos

MT3 – Receptor nuclear para melatonina presente em linfócitos

Mx – Meloxicam

NEED – N-(1-Naphthyl)ethyl-enedamine

NIC – Não Infectados Controle

NIT – Não Infectados Tratados

NK – Natural Killer

NO – Óxido Nítrico

NO₂⁻ – Nitrito

PEG 400 – Polietileno Glicol 400

PGE₂ – Prostaglandina E₂

rIL-10 – Interleucina 10 recombinante

rTGF-β – Fator de crescimento transformador-*beta* recombinante

TGF-β – Fator de crescimento transformador-*beta*

Th-1 – T Helper 1

Th-2 – T Helper 2

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma das mais sérias doenças parasitárias da América Latina, com impacto social e econômico de peso bem maior do que os efeitos combinados de outras doenças parasitárias como malária, leishmaniose e esquistossomose (WHO, 2003). Tem por agente etiológico, o flagelado digenético *Trypanosoma cruzi*. O tratomínio após realizar a hematofagia em um hospedeiro, libera as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes ou urina que penetram através da solução de continuidade proliferando-se ativamente no interior de macrófagos. Findo este ciclo, as células parasitadas se rompem, liberando centenas de tripomastigotas que ganham a circulação sendo sua detecção no sangue periférico uma característica da fase aguda da doença. Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção é controlada através da resposta imune dirigida contra o parasito, determinando o desaparecimento das formas tripomastigotas do sangue. (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1991). A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, podendo ser reproduzido nos mesmos, os distintos aspectos patológicos da doença humana (BORGES et al., 1992; CARDILO et al., 1996; SANTOS et al., 2005). A utilização de roedores em pesquisa contribuiu para ajudar a detalhar a descrição celular, molecular e fenomenológica do sistema imune de mamíferos. O estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados por *T. cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, semelhante às causadas na doença humana (BRENER et al., 2000).

1.2.Imunologia da Doença de Chagas

De acordo com estudos realizados durante a última década, o padrão de produção de citocinas determina o resultado da infecção por *T.cruzi*. A investigação de camundongos desprovidos de genes transcricionais (animais knockout) para determinadas citocinas como IFN- γ , TNF- α , e IL-12 ou, a neutralização por anticorpos murinos anti estas citocinas, agrava a infecção causada pelo parasito (GALVÃO DA SILVA et al., 2003; SILVA et al., 1995; TORRICO et al., 1991). Além disso, (NICKELL & KEANE., 1993) usando clones específicos de linfócitos para *T. cruzi*, mostraram que estas células produzem as citocinas IL-2 e IFN- γ , que apresentam um papel protetor no hospedeiro durante a infecção chagásica experimental.

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, uma imunossupressão com redução nas respostas linfoproliferativas para antígenos do parasito é observada (PINGE-FILHO et al., 1999; REED et al., 1977). A diminuição da produção de IL-2/IL-2r, (ROTTENBERG et al., 1989; TARLETON., 1988), apoptose (FREIRE DE LIMA et al, 2000) e o aumento exacerbado da produção de óxido nítrico e da síntese de prostaglandinas (BORGES et al., 1998; PINGE-FILHO et al., 1999), têm sido citados como mecanismos supressores envolvidos na doença de Chagas e outras parasitoses. O óxido nítrico produzido principalmente por iNOS, é considerado um mediador importante da atividade microbida de macrófagos e de outras células fagocíticas profissionais (FIERRO et al., 1999; LIEW et al., 1990), Esta molécula também apresenta importante atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA & ZILBERSTEIN, 2002) sendo considerada também uma molécula efetora microbida contra patógenos como *T. cruzi* (GAZINELLI et al., 1992). Tipicamente, a indução de resposta Th1 específica para o parasito, mas não a resposta Th2, protege camundongos BALB/c

contra cepas virulentas de *T. cruzi* (HOFT et al., 2000). Reforçando esses dados, estudos baseados em neutralização por anticorpos murinos anti-citocinas padrão Th2 como IL-4, IL-10, ou TGF- β não modificaram a supressão das respostas linfoproliferativas, e a adição de rIL-10 ou de rTGF- β também não recuperou a proliferação celular (ABRAHAMSOHN & COFFMAN., 1995).

1.3. Prostaglandinas, Citocinas e Inibidores de (COX)

As enzimas conhecidas como ciclooxigenases (COX) estão envolvidas nas reações enzimáticas com o ácido araquidônico, resultando na síntese de prostaglandinas (PG). Existem pelo menos duas isoformas de (COX); tipo 1, que é constitutiva (SMITH & DEWITT., 1996), e tipo 2, que é induzida por mediadores inflamatórios, principalmente, citocinas (HERSCHMAN., 1996). A prostaglandina E_2 (PGE_2) produzida principalmente pela COX-2 medeia a imunossupressão observada na fase aguda da infecção por *T.cruzi* (FREIRE DE LIMA ET al., 2000; MICHELIN et al., 2005), além disso, há evidências de que a produção de PGE_2 inibe a síntese de IL-2/IL-2 receptor (CILLARI et al., 1986; WALKER et al., 1983) e IFN- γ (KATAMURA et al., 1995). Por outro lado, a PGE_2 direciona as respostas imunológicas no sentido da produção de citocinas padrão Th2, através de sua ação em clones Th0 (FREIRE DE LIMA et al., 2000). O uso de Meloxicam, um inibidor seletivo de COX-2 (ENGELHARDT et al., 1996) restabelece a linfoproliferação e a produção de IL-2, além de reduzir drasticamente a parasitemia sanguínea em camundongos Balb-c infectados por *T. Cruzi*. Estes efeitos provavelmente são atribuídos à inibição da síntese das prostaglandinas, principalmente PGE_2 , pelos inibidores de COX-2. (MICHELIN et al., 2005). Em relação às citocinas padrão Th2, (REED ET AL., 1994; REVELLI ET AL., 1999) demonstraram um aumento da produção de IL-4 e IL-10 em infecção causada por *T.cruzi*. O tratamento com Meloxicam inibiu a produção destas citocinas, sugerindo que as prostaglandinas sintetizadas por COX-2 estimulam a produção de IL-4 e IL-10, as quais medeiam, pelo menos em parte, os efeitos imunossupressores da doença (MICHELIN et al., 2005).

1.4. Melatonina e o Sistema Imune

Classificada atualmente como um neurohormônio, N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) é um derivado do aminoácido essencial triptofano, sendo isolada pela primeira vez, a partir da glândula pineal de bovinos (LERNER et al., 1960). A produção de Melatonina pela glândula pineal é caracterizada por um ritmo circadiano, com baixos níveis durante o dia e níveis altos durante a noite (CLAUSTRAT & CHAZOT., 2005).

Correlações diretas entre a produção de melatonina e variações circadianas e sazonais no sistema imune têm sido observadas (NELSON & DRAZEN., 2000). Dados *in vivo* e *in vitro* confirmam as relações entre a melatonina e o sistema imune, evidenciadas por: 1 - Efeitos da pinealectomia em modelos experimentais, 2 - Alterações de parâmetros imunológicos decorrentes da administração *in vivo* de melatonina, 3 - Presença de receptores específicos em células do sistema imune e 4 - Regulação da atividade celular imune pela melatonina em estudos *in vitro* (GUERRERO & REITER., 2002). Estudos demonstram que a pinealectomia promove desorganização tímica (JANKOVIC et al., 1970), depressão na resposta imune humoral e celular (MAESTRONI et al., 1986), além de inibição da síntese de IL-2 e da atividade das células natural killer em roedores (DEL GOBBO et al., 1989). A administração *in vivo* de melatonina causa importantes alterações nos parâmetros imunológicos de mamíferos, incluindo humanos, demonstrando um efeito imunoestimulatório do neurohormônio (LISSONI et al., 1986). Tem sido atribuído à administração da melatonina, um aumento da atividade de células NK em humanos (LISSONI et al., 1986; ANGELI et al., 1987), assim como um aumento dos níveis plasmáticos de IL-2 em camundongos Balb-c (MOCCHEGIANI et al., 1996). Além

disso, (PIOLI et al., 1993) demonstraram um aumento da apresentação de antígenos para linfócitos T por macrófagos esplênicos de camundongos C57BL/10 concomitante a um aumento da expressão de moléculas MHC classe II. Estudos *in vitro* revelam que a melatonina ativa a produção de IL-2, IL-6 e IFN- γ por células T helper e monócitos (GARCÍA-MAURIÑO et al., 1997). A melatonina também aumenta a produção de IL-12 por monócitos direcionando uma diferenciação de células T para o fenótipo Th1 e causando um aumento da produção de IFN- γ (GARCÍA-MAURIÑO et al., 1999). Os mecanismos de ação da melatonina, têm sido descritos a partir de interações com receptores de membrana (MT1 e MT2), recentemente clonados, MT3 extraído e purificado por afinidade (DUBOCOVICH., 1995; DUBOCOVICH et al., 2003) e a partir de ligações a receptores nucleares pertencentes a superfamília RZR/ROR (WIESENBERG et al., 1995; BECKER-ANDRE et al., 1994). De acordo com a Figura 1, a interação da melatonina com receptores nucleares parece ativar a produção de IL-2 (GARCÍA-MAURIÑO et al., 2000), ao passo que, a interação com receptores de membrana MT1 em linfócitos humanos, tem sido descrita como o mecanismo responsável pela habilidade da Melatonina em contrabalancear os efeitos inibitórios da PGE₂ via AMP-c induzindo a síntese de IL-2 (CARRILLO-VICO et al., 2003).

Figura 1: Mecanismos de ação da melatonina em células do sistema imune via receptor de membrana MT1 - contrabalanceando os efeitos inibitórios da PGE₂ via AMP-c induzindo a síntese de IL-2. Receptor nuclear RZR/ROR – indução direta da síntese de IL-2 (CARRILLO-VICO et al., 2003).

2. OBJETIVOS DO PROJETO

O objetivo final do projeto foi verificar o impacto da associação terapêutica melatonina / meloxicam em relação à carga parasitária sistêmica e cardíaca em ratos *Wistar* machos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Como segundo objetivo, foi analisado a produção de prostaglandina E₂ pelas células peritoneais, assim como o nível de citocinas pertencentes aos padrões Th1 e Th2 no soro dos animais infectados e não infectados, sendo estes parâmetros também avaliados nestes animais tratados ou não pelos diferentes esquemas terapêuticos.

2.1. Objetivo complementar

Como objetivo complementar neste trabalho, foi também avaliado a produção de Nitrito pelas células peritoneais dos animais em estudo, permitindo uma avaliação indireta da produção de NO por essas células e, conseqüentemente, uma avaliação da atividade tripanossomicida no modelo experimental estudado.

3. JUSTIFICATIVA

Seguindo as linhas de pesquisa de novas terapias para o controle da doença de Chagas, o presente estudo teve por objetivo investigar uma possível ação sinérgica entre melatonina e meloxicam no controle da infecção por *T. cruzi*. Para tanto, avaliamos a produção de citocinas Th1 e Th2, relevantes na fase aguda da doença, níveis de prostaglandina E2, níveis de nitrito, parasitemia sanguínea e tecidual cardíaca em ratos *Wistar* machos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Ratos *Wistar* foram utilizados devido a uma maior resistência desses animais ao tratamento com as drogas e também devido às quantidades relativamente grandes de soro necessárias para as análises. A administração de melatonina contribuiu na proteção do hospedeiro submetido à infecção experimental por *T. cruzi* devido às ações imunoestimulatórias previamente atribuídas a esta substância. Houve um aumento da síntese de citocinas importantes na proteção do hospedeiro durante a fase aguda da infecção Chagásica experimental, tais como IFN- γ , IL-2 e NO. O aumento da síntese de PGs tem sido citado como um dos mecanismos supressores envolvidos na doença de Chagas. Este aumento pôde ser contrabalanceado pela administração da associação de melatonina e meloxicam. O bloqueio da síntese de PGE₂ atribuído à administração de meloxicam e/ou melatonina durante a fase aguda da infecção Chagásica experimental foi seguido por uma modulação de citocinas pertencentes aos padrões Th-1 e Th-2. Estes efeitos demonstrados no estudo foram benéficos, sendo evidenciados pela diminuição da carga parasitária dos animais experimentais. Os resultados poderão auxiliar a estabelecer mecanismos alternativos de tratamento na infecção chagásica aguda através de um melhor entendimento das respostas imunológicas anti-*T. cruzi*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e infecção por *T. cruzi*

Foram utilizados ratos *Wistar* machos pesando entre 90-100g, provenientes de uma colônia mantida nos biotérios da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração e divididos em oito grupos com ($n = 5$) que foram eutanasiados em três dias diferentes após o inóculo infectante (n total = 120).

4.1.2 – Infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Os animais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 1.0×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T.cruzi* (SILVA & NUSSENZWEIG., 1953).

4.1.3 - Grupos Experimentais

Tabela 1 - Grupos experimentais e dias de experimento

Grupo Infectado pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>		Grupos controle	
Infectados Controle - (IC) n = 5		Não Infectados Controle - (NIC) n = 5	
Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel) n = 5		Não Infectados Tratados com Melatonina - NIT (Mel) n = 5	
Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx) n = 5		Não Infectados Tratados com Meloxicam - NIT (Mx) n = 5	
Infectados Tratados com Melatonina e Meloxicam - IT (Mel +Mx) n = 5		Não Infectados Tratados com Melatonina e Meloxicam - NIT (Mel + Mx) n = 5	
Dias de experimento	7ºdia	14ºdia	21ºdia

4.2 - Drogas e protocolo de tratamento

Após diversos testes de solubilidade com diferentes solventes, optamos por utilizar Polietileno glicol 400 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). PEG 400 tem sido utilizado para aumentar as características de dissolução de compostos com baixa solubilidade aquosa (MIRALLES et al., 1982). Além disso, a escolha do veículo ideal de dissolução para os experimentos foi baseada na boa solubilidade simultânea dos dois compostos utilizados no estudo (melatonina e meloxicam), características não tóxicas e não irritantes dos polietileno glicóis (SMYTH et al., 1950) e solubilidade destes em água.

Melatonina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi dissolvida em PEG-400 e uma quantidade igual de volume de água destilada foi adicionada para diminuir a viscosidade do veículo. A mistura 1:1 de PEG 400 e H₂O foi administrada a uma dose de 5mg/kg/peso, via oral nos grupos de animais estudados. A dose foi baseada em nossos estudos prévios (SANTELLO et al., 2007).

Meloxicam (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi dissolvido no mesmo veículo e também administrado após mistura de água destilada - 1:1 PEG 400 e H₂O por via oral a uma dose de 0,5 mg/kg/peso (MICHELIN et al., 2005). A combinação das drogas foi administrada em solução como citado acima e o tratamento realizado pela manhã, durante 21 dias. Cada animal recebeu 250 µL das soluções contendo apenas uma das drogas ou ambas em combinação.

4.3 - Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados previamente com Tribromoetanol (2.5%) dose de 0,01 mL/grama e decapitados. O anestésico causou inconsciência em função da dose provocando uma ausência de percepção das sensações, numa relação dose-efeito. A decapitação foi utilizada por ser um método rígido, eficaz e seguro. Tais procedimentos foram tomados visando um mínimo de dor, medo e angústia, além de evitarem que outras manipulações aumentem o efeito do estresse, provocando alterações nos resultados das dosagens investigadas. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo comitê de ética local, número (07.1.347.53.0).

4.4 – Parasitemia

O curso da infecção foi monitorado nos 7°, 14° e 21° dias após o inóculo infectante, através da contagem do número de tripomastigotas em amostras sanguíneas heparinizadas de 5 µL. A média foi calculada a partir do número de parasitas em cinquenta campos, sendo o resultado multiplicado pelo fator do microscópio, como descrito por (BRENER.,1962).

4.5 - Quantificação de Nitrito

Células peritoneais foram obtidas após a injeção de 10 mL de meio RPMI 1640 (Cultlab, Campinas, Brasil) na cavidade peritoneal dos animais utilizados no estudo. Estas células foram centrifugadas por 15 minutos e o pellet foi resuspendido em meio RPMI 1640 completo e, posteriormente, diluído em solução de Turkey. O número de células foi acertado para uma concentração de 5×10^6 células/mL utilizando-se câmara de Neubauer. As células foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas. A quantidade de nitrito acumulada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais foi determinada por método espectrofotométrico, utilizando-se o reagente de Griess. As absorbâncias foram lidas a 540 nm e a concentração de nitrito foi obtida por comparação com uma curva padrão construída por diluições seriadas de nitrito de sódio que variavam de 100 a 1,56 µM. (Ding et al., 1988). O reagente de Griess foi preparado pela mistura de volumes iguais de 1% de sulfanilamida em 5% de H₂PO₄ e 0,1% de N-(1-Naphthyl)ethyl-enedinamine – NEED. Os dados foram expressos em µM, sendo a concentração mínima detectável de 1,56 µM.

4.6 - Quantificação de Prostaglandina E₂

De maneira similar ao ensaio acima, 10 mL de meio Hank's gelado (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 180 g em uma temperatura de 4° C e o pellet foi suspenso em meio Hank's completo contendo Ca²⁺ /Mg²⁺ (1x10⁶ células/mL). Subseqüentemente, as células foram estimuladas com Ionóforo de Cálcio A23187 [0,5µM] (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por 15 minutos. A reação foi interrompida por choque térmico no gelo e as amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 180 g em uma temperatura de 4° C. Os sobrenadantes foram recolhidos e a PGE₂ acumulada foi quantificada por técnica de ligação competitiva (ELISA) (Regular Sensitivity Option) R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Todas as amostras foram processadas individualmente e os ensaios foram feitos em duplicata. As placas foram lidas em comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplacas. As absorvâncias detectadas referentes à prostaglandina E₂ foram correlacionadas aos valores de absorvância obtidos na curva padrão e as concentrações das mesmas; calculadas por interpolação através do software estatístico Prisma. O limite de detecção sob as condições deste ensaio está indicado no parêntese (39 pg/mL).

4.7 - Ensaios de Citocinas do grupo Th-1 e Th-2

Os níveis de citocinas dos soros dos animais foram obtidos nos 7^o, 14^o e 21^o dias pós infecção, sendo detectados por técnica de imunoensaio enzimático quantitativo (ELISA) R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Foram construídas curvas padrão para cada ensaio utilizando-se quantidades conhecidas das respectivas citocinas recombinantes de acordo com as instruções do kit utilizado. Todas as amostras foram processadas individualmente e analisadas em duplicata, sendo a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. As absorbâncias detectadas referentes a cada citocina foram correlacionadas aos valores de absorbância obtidos na curva padrão e as concentrações das mesmas; calculadas por interpolação através do software estatístico Prisma. Utilizou-se regreção não linear, sendo as concentrações calculadas a partir de uma equação polinomial de quarta ordem, de acordo com o fabricante. O limite de detecção de cada citocina, nas condições de nossos ensaios está indicado nos parênteses: IL-2 (31,2 pg/mL); IFN- γ (31,2 pg/mL), TNF- α (12,5 pg/mL), IL-4 (15,6 pg/mL) e IL-10 (31,2 pg/mL).

4.8. Técnica histológica e intensidade do parasitismo tecidual

Em cada dia do experimento, foram coletados os corações dos animais utilizados no estudo. Os órgãos foram lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em Formol 10% tamponado e incluídos em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos de 6 μ m corados por Hematoxilina-Eosina. A montagem em laminas foi realizada com intervalo de 70 μ m, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi*. Os cortes foram examinados em microscópio óptico com aumento de 1000x. O grau de parasitismo foi estimado através da quantificação do numero de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400x), sendo considerados todos os ninhos encontrados em cada campo (CASTRO & BRENER, 1985). Para esta análise foram utilizados 5 de cada grupo experimental.

4.9 - Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão da media (e.p.m), sendo o teste estatístico One-way ANOVA, utilizado para análise dos dados. A significância estatística entre os grupos foi determinada pelo teste Tukey e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas com auxílio do software Graph Pad Prism versão 5.0.

5 - RESULTADOS

5.1 - Parasitemia durante o curso da infecção aguda.

Figura 2. Número de parasitas sanguíneos de ratos *Wistar* machos infectados via intraperitoneal com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da doença (7°, 14°, 21° dias pós infecção), para os seguintes grupos: Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx). Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento. *p < 0.05 vs IC (14° dia pós infecção).

Como mostrado na figura 2, o pico de parasitemia ocorreu no 14° dia após a infecção e todos os grupos mostraram uma drástica redução de parasitas após o 21° dia. Melatonina, meloxicam e o tratamento em associação com ambas as substâncias causaram uma significativa redução da parasitemia nos animais tratados em comparação com os animais que não foram submetidos a nenhum tratamento [14° dia após a infecção. (P < 0,05)].

O teste estatístico One-way ANOVA - Tukey's Multiple Comparison Test forneceu uma variedade de comparações entre os grupos estudados e conseqüentemente, um grande número de resultados com diferenças estatísticas a um nível de significância de 0,05 ou 0,01.

Para melhor interpretação dos resultados, os gráficos em diante contendo todos os grupos de animais foram divididos; sendo consideradas e discutidas as comparações mais relevantes ao longo da infecção. Nos gráficos simplificados, uma média dos valores obtidos de todos os grupos não infectados (barras em azul) foi calculada. O valor da média foi utilizado como controle não infectado (NIC).

5.2 - Produção de PGE₂ por células peritoneais de todos os animais utilizados no estudo

Figura 3. Ensaio de PGE₂ durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados Controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas. Os sobrenadantes das culturas continham o número aproximado de 5×10^6 células peritoneais. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

5.2.1 - Níveis de PGE₂ durante o curso da infecção aguda

Figura 3A. Ensaio de PGE₂ durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx) e Não Infectados Controle. Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os sobrenadantes das culturas continham o número aproximado de 5×10^6 células peritoneais. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. * $p < 0.05$ – IT (Mel + Mx) vs IC e IT (Mx) vs IC (7^o, 14^o, e 21^o) dias pós infecção.

Os níveis de prostaglandina E₂ sintetizada por células peritoneais dos animais infectados com *T. cruzi* são mostrados na figura 3A. Ratos *Wistar* machos infectados e tratados com meloxicam e infectados tratados com a associação melatonina/meloxicam foram capazes bloquear significativamente a síntese deste mediador lipídico durante o curso da infecção aguda (* $P < 0.05$).

5.3 - Níveis de IL-2 nos soros de todos os animais utilizados no estudo

Figura 4. Ensaio de IL-2 durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados Controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento. *p < 0.05

Os níveis de IL-2 mantiveram-se mais baixos nos soros dos animais Infectados Controle (IC), sendo este resultado, característico da imunossupressão de fase aguda da doença de Chagas (ROTTENBERG et al., 1989; TARLETON., 1988).

5.3.1 - Níveis de IL-2 durante o curso da infecção aguda

Figura 4A. Ensaio de IL-2 durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx) e Não Infectados Controle (NIC). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. * $p < 0.05$ – IT(Mel + Mx) vs IC (7^o, 14^o, e 21^o) dias pós infecção.

Analizamos na figura 4A, o impacto dos diferentes tratamentos sobre os níveis de IL-2 nos soros dos animais infectados em relação ao grupo infectado controle (IC), durante o curso da infecção. Este resultado evidencia uma recuperação dos níveis de IL-2 com diferença estatística a um nível de significância de 0,05 para os animais infectados tratados com melatonina + meloxicam em relação ao grupo infectado controle (IC) durante os (7^o, 14^o, e 21^o) dias pós infecção.

* $p < 0.05$ - IT(Mel + Mx) vs IC.

5.4 - Níveis de TNF- α nos soros de todos os animais utilizados no estudo

Figura 5. Ensaio de TNF- α durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

5.4.1 - Níveis de TNF- α durante o curso da infecção aguda

Figura 5A. Ensaio de TNF- α durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx) e Não Infectados Controle. Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

A figura 5A demonstra que os níveis de TNF- α estão mais elevados nos animais infectados em relação ao grupo controle, porém, nenhum dos tratamentos alterou de forma significativa as concentrações desta citocina durante o curso da infecção. Os níveis de TNF- α apresentam-se similares aos do grupo controle (NIC) no 21^o dia de infecção, resultado este que pode estar relacionado com a baixa presença de tripomastigotas sanguíneos nos animais infectados neste período da infecção.

5.5 - Níveis de INF- γ nos soros de todos os animais utilizados no estudo

Figura 6. Ensaio de INF- γ durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

5.5.1 - Níveis de INF- γ durante o curso da infecção aguda

Figura 6A. Ensaio de IFN- γ durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados, Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. * $p < 0.05$ – IT(Mel + Mx) vs IC ; IT(Mel) vs IC e IT(Mx) vs IC (7^o e 14^o dias pós infecção).

Um aumento significativo das concentrações de IFN- γ foi observado para todos os grupos tratados com melatonina, meloxicam e combinação de ambas as substâncias em relação ao grupo infectado controle durante o 7^o e 14^o dias pós infecção, com diferenças estatísticas a um nível de significância de 0,05, porém, essa diferença não foi observada no 21^o dia. De acordo com (KATAMURA et al.,1995), a PGE₂ inibe a síntese de IFN- γ , porém, de acordo com a figura 6A, todos os tratamentos parecem recuperar os níveis desta citocina.

5.6 - Produção de Nitrito por células peritoneais de todos os animais utilizados no estudo

Efeito dos tratamentos sobre a produção de nitrito por macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi*

Figura 7. Ensaio de Nitrito durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os sobrenadantes das culturas continham o número aproximado de 5×10^6 células peritoneais. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

Tabela 2: Produção de Nitrito por Macrófagos Peritoneais de Ratos *Wistar* Machos Infectados pela cepa Y de *T. cruzi*

Grupos experimentais (n = 5)	Nitrito (μM) em Sobrenadantes de Cultura ^a		
	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Não Infectados Controle	23,69 $\pm$ 1,58 ^b	25,39 $\pm$ 3,28	33,36 $\pm$ 6,82
Infectados Controle (IC)	34,44 $\pm$ 3,67	40,79 $\pm$ 2,37	51,18 $\pm$ 8,27
IT (Melatonina)	38,84 $\pm$ 4,41	54,45 $\pm$ 5,69	45,23 $\pm$ 3,53
IT (Meloxicam)	62,13 $\pm$ 3,04*	84,14 $\pm$ 4,67*	59,68 $\pm$ 4,45*
IT (Melatonina/Meloxicam)	69,39 $\pm$ 3,87* [#]	81,93 $\pm$ 3,96* [#]	64,86 $\pm$ 4,05* [#]

^a – Os sobrenadantes das culturas continham o número aproximado de 5×10^6 células peritoneais obtidas de ratos *Wistar* machos infectados ou não com 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas e tratados ou não com melatonina, meloxicam e associação de ambos durante o curso da infecção.

^b - Médias $\pm$ erro padrão da média.

* $P < 0,05$ - IT(Mel + Mx) vs IC and IT(Mx) vs IC - (7º, 14º, and 21º) dias pós infecção.

[#] $P < 0,05$ - IT(Mel + Mx) vs IT(Mel) - (7º, 14º, and 21º) dias pós infecção.

A produção de nitrito (NO_2^-) por células peritoneais obtidas de ratos infectados pela cepa Y de *T. cruzi* foi elevada ao longo da infecção. Altos níveis de nitrito foram observados nos grupos: infectados tratados com meloxicam IT (Mx) e infectados tratados com a associação melatonina/meloxicam IT (Mx+Mel) em relação ao grupo infectado controle (* $P < 0.05$). Além disso, os tratamentos usando as drogas em associação apresentaram mais altos níveis de nitrito quando comparados com os animais que receberam o tratamento com apenas melatonina durante o curso da infecção, ocorrendo diferença estatística a um nível de significância de 0,05 na comparação entre estes grupos. ([#] $P < 0.05$) Tabela 2.

5.7 - Níveis de IL-4 nos soros de todos os animais utilizados no estudo

Figura 8. Ensaio de IL-4 durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

5.7.1 - Níveis de IL-4 durante o curso da infecção aguda

Figura 8A. Ensaio de IL-4 durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados, Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, n = 5/ grupo/ dia de experimento.

*p < 0.01 – IT (Mx) vs IC e *p < 0.01 – IT (Mel + Mx) vs IC (7^o, 14^o e 21^o) dias pós infecção.

[#]p < 0,05 – IT (Mel) vs IC (7^o, 14^o e 21^o) dias pós infecção.

De acordo com os resultados deste estudo, os níveis de IL-4 mantiveram-se relativamente altos durante o curso da infecção nos animais que não receberam nenhum tratamento (IC), ao passo que os três diferentes tratamentos parecem interferir nos níveis de produção desta interleucina. O tratamento com melatonina favoreceu um decréscimo dos níveis de IL-4 durante o curso da infecção, com significância estatística de 0,05 [[#]p < 0,05 – IT (Mel) vs IC (7^o, 14^o e 21^o)] dias pós infecção. Os demais tratamentos favoreceram um decréscimo dos níveis de IL-4

com significância estatística de 0,01 [$*p < 0.01$ – IT (Mx) vs IC e $*p < 0.01$ – IT (Mel + Mx) vs IC (7°, 14° e 21°)] dias pós infecção. Figura 8A.

5.8 - Níveis de IL-10 nos soros de todos os animais utilizados no estudo

Figura 9. Ensaio de IL-10 durante a fase aguda da doença (7°, 14°, 21° dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados controle (NIC), não infectados tratados com Melatonina NIT (Mel), não infectados tratados com Meloxicam NIT (Mx), não infectados tratados com Melatonina + Meloxicam NIT (Mel + Mx), Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel +Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento.

5.8.1 - Níveis de IL-10 durante o curso da infecção aguda

Figura 9A. Ensaio de IL-10 durante a fase aguda da doença (7^o, 14^o, 21^o dias pós infecção), para os seguintes grupos: Não Infectados, Infectados Controle (IC), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx) e Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx). Número de formas infectantes - 1×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ e.p.m, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento.

* $p < 0.05$ – IT (Mx) vs IC e * $p < 0.05$ – IT (Mel) vs IC (7^o e 14^o) dias pós infecção.

$p < 0,01$ – IT (Mel+ Mx) vs IC (7^o e 14^o) dias pós infecção.

Após os diferentes tratamentos, os níveis de IL-10 diminuíram significativamente nos 7^o e 14^o dias pós infecção, sendo que no 21^o dia, os níveis desta interleucina tendem a estabilizar-se mediante a uma recuperação do sistema imune dos animais utilizados no estudo frente a infecção chagásica aguda experimental. Figura 9A.

5.9 - Parasitismo Tecidual do Coração

Tabela 3. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Grupos experimentais (n = 5)	Número de ninhos de amastigotas (Média ± DP [#])		
	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Infectados Controle (IC)	8 ± 3,7	27 ± 6,6	26 ± 6,1
IT (Melatonina)	6 ± 1,8	13 ± 5,1*	10 ± 3,1*
IT (Meloxicam)	5 ± 1,1	10 ± 5,2*	11 ± 2,3*
IT (Melatonina/Meloxicam)	5 ± 1,9	9 ± 3,6 *	7 ± 2,5*

[#] DP: Desvio Padrão

Intensidade do parasitismo tecidual cardíaco durante o curso da infecção. Infectados Controle (IC), Infectados tratados com melatonina – IT (Melatonina), Infectados tratados com meloxicam – IT (Meloxicam), Infectados tratados com melatonina e meloxicam – IT (Melatonina/Meloxicam). Os resultados da tabela são expressos em médias ± D.P, n = 5/ grupo/ dia de experimento, *p < 0,05 – Todos os grupos vs (IC), 14° e 21° dias pós infecção. Foram observados 50 campos microscópicos (400x) por animal.

Como demonstrado na Tabela 3, os diferentes tratamentos reduziram significativamente o número de ninhos de amastigotas nos dias 14 e 21 da fase aguda da doença quando comparados com os grupos infectados controle (IC).

5.10 – Histopatologia do Coração (14^o dia)

5.10.1 – Grupos não infectados: Tratados ou não pelos diferentes esquemas terapêuticos

Figura 10. Cortes histológicos (6 μ m) de corações de ratos *Wistar* machos não infectados obtidos no 14 dia de experimento. Grupos: **A** - Grupo não infectado controle (NIC), **B** - Grupo não infectado tratado com melatonina NIT (Mel), **C** - Grupo não infectado tratado com meloxicam NIT (Mx), **D** - Grupo não infectado tratado com melatonina + meloxicam NIT (Mel+Mx). Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

As fibras cardíacas dos animais pertencentes aos grupos controles do 14^o dia de experimento apresentam aspecto histológico normal, sem alterações teciduais.

5.10.2 – Grupos infectados: Tratados ou não pelos diferentes esquemas terapêuticos

Figura 11. Cortes histológicos (6 μ m) de corações de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* obtidos no 14^o dia de experimento. Grupos: **A** - Grupo infectado controle (IC), **B** - Grupo infectado tratado com melatonina IT (Mel), **C** - Grupo infectado tratado com meloxicam IT (Mx), **D** - Grupo infectado tratado com melatonina + meloxicam IT (Mel+Mx). Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

Observa-se um parasitismo tecidual mais intenso no grupo infectado controle (**A**), quando comparado aos grupos infectados tratados com os diferentes esquemas terapêuticos (**B**), (**C**) e (**D**). Foram observados em 50 campos microscópicos (400x).

5.11 - Síntese dos resultados obtidos mediante os diferentes tratamentos

O balanço dos parâmetros imunológicos estudados, assim como a importante redução da parasitemia sanguínea sugere uma recuperação do sistema imune dos animais utilizados no estudo após tratamento com os diferentes esquemas terapêuticos. Uma visão geral qualitativa dos resultados obtidos pode ser demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4: Síntese do balanço dos níveis de Citocinas Th-1, Th-2, NO₂⁻, PGE₂ e Parasitemia em relação aos animais infectados controle (IC).

Dias de Infecção	Animais	Parâmetros Analisados *							
		IL-2	TNF-α	INF-γ	IL-4	IL-10	NO ₂ ⁻	PGE ₂	Parasitas [#]
7°	(IC)	↓↓↓	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑
	IT(Mel)	↑	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑	↓	↓
	IT(Mx)	—	—	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓
	IT(Mel+Mx)	↑↑↑	—	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓
14°	(IC)	↓↓↓	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑
	IT(Mel)	↑↑	—	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑	↓	↓↓↓
	IT(Mx)	↑↑	↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓
	IT(Mel+Mx)	↑↑↑	—	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓
21°	(IC)	↓↓	—	↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑↑	↓↓↓
	IT(Mel)	—	—	—	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓
	IT(Mx)	↑	—	↑	↓↓↓	—	↑	↓↓↓	↓↓↓
	IT(Mel+Mx)	↑↑↑	—	↑	↓↓↓	↓	↑	↓↓↓	↓↓↓

Visão geral qualitativa dos resultados obtidos no estudo

[#] Valores referentes à parasitemia sanguínea

*As setas indicam alta, média ou baixa redução ou aumento dos parâmetros analisados

6 – DISCUSSÃO

O padrão da produção de citocinas pode determinar o resultado da infecção por *T. cruzi* (MICHELIN et al., 2005). A resistência a infecção pelo protozoário pode ser associada à capacidade dos linfócitos em gerar IFN- γ , o qual ativa macrófagos, que por sua vez destroem a forma amastigota intracelular do parasita (REED, 1988). A atividade tripanossomicida de macrófagos ativados por IFN- γ é mediada por um mecanismo dependente da biossíntese de óxido nítrico (NO). Por outro lado, a suscetibilidade a infecção está associada com a produção da interleucina IL-10 (GAZZINELLI et al., 1992) e TGF- β (SILVA et al., 1991).

Tem sido informado na literatura, e também de acordo com este estudo, que modelos murinos experimentais infectados por *T. cruzi* apresentam imunossupressão progressiva, correlatando com o agravamento da doença. Alterações no sistema imune dos hospedeiros, tais como, altos níveis de PGE₂ e supressão da linfoproliferação com baixos níveis de IL-2 durante a fase aguda de infecção têm sido observados na doença de Chagas (PINGE-FILHO et al., 1999; FREIRE DE LIMA et al, 2000; ABDALLA et al, 2008). Além disso, tornou-se claro que IFN- γ e NO são importantes mediadores de resistência contra *T. cruzi* (SILVA et al., 2003; TORRICO et al., 1991). Reforçando estes dados, linhagens deficientes para receptores de (IFN- γ R-/-) ou deficientes para óxido nítrico sintase induzível (iNOS-/-) foram altamente suscetíveis a infecção por *T. cruzi* com aumento similar da carga parasitária (HOLSCHER et al., 1998). A regulação simultânea dessas moléculas conduz a um estímulo da resposta imune contra parasitas altamente complexos tais como *T. cruzi*, sendo que os hospedeiros geralmente restabelecem uma resposta

apropriada com diminuição da parasitemia e de outros efeitos patológicos (PINGE-FILHO et al., 1999).

No presente estudo, nós investigamos possíveis relações entre vários parâmetros imunológicos, tais como, PGE_2 , NO, $IFN-\gamma$, IL-2, IL-4 e IL-10, além de avaliarmos a carga parasitária sanguínea e cardíaca dos animais utilizados nos experimentos durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*. Foram investigados também, todos os grupos controle de acordo com a tabela 1.

Nossos resultados sugerem que a supressão da resposta imune durante o curso da doença foi mais intensa no 14º dia pós infecção, uma vez que os animais apresentaram alta parasitemia sanguínea concomitante com os mais baixos níveis de IL-2, a qual é considerada como principal fator de crescimento para a expansão clonal de células Th1 (BETZ & FOX., 1991), sendo detectados também, altos níveis de PGE_2 neste período.

Estes resultados sugerem que, nesta fase da infecção, o bloqueio da síntese de PGE_2 foi crucial no processo de reversão da imunossupressão, característico da doença. Os animais tratados com a associação de ambas as substâncias foram capazes de recuperar de maneira satisfatória e constante, os níveis plasmáticos de IL-2 durante o curso da infecção. Nós sugerimos que houve um estímulo da resposta imune dos animais utilizados como modelo experimental, sendo que esse estímulo poderia estar atribuído aos efeitos da combinação de ambas as substâncias.

O papel modulatório da melatonina poderia ser explicado pela sua habilidade de aumentar a produção de $IFN-\gamma$ realizada por células Th1 (CARRILLO-VICO et al., 2005), assim como através da interação entre melatonina e receptores nucleares presentes em linfócitos, os quais ativam a produção de IL-2 (GARCÍA-MAURIÑO et

al., 1998), e/ou contrabalanceando os efeitos inibitórios da PGE₂ via uma transdução de sinal dependente de AMP-c (CARRILLO-VICO et al., 2003).

A inibição da ciclooxygenase por tratamento com meloxicam, ou associação meloxicam/melatonina resultou em significativa redução da síntese de PGE₂ durante o curso da doença, concomitante com o aumento da síntese de IFN- γ e NO. Sugerimos que a modulação de citocinas devido à ação de meloxicam, provavelmente está relacionada com o bloqueio da síntese de PGE₂, entretanto, alguns estudos têm mostrado que inibidores de COX-2 podem também, agir diretamente na modulação da expressão de citocinas através da inibição de fatores de transcrição, tais como AP-1 e Erk (TEGEDER et al., 2001).

De acordo com (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000), PGE₂ poderia agir em clones de linfócitos Th0, induzindo a síntese de citocinas padrão Th2. Por outro lado, a inibição de COX-2 e conseqüentemente de PGE₂ poderia restabelecer a expressão de citocinas padrão Th1, tais como IL-2 e IFN- γ , bem como a síntese de NO por macrófagos ativados por IFN- γ .

Experimentos *in vitro* têm mostrado que o NO derivado de macrófagos ativados é citotóxico para uma variedade de patógenos incluindo *Leishmania major* (ASSREUY et al., 1994), *Toxoplasma gondii* (ADAMS et al., 1990), *Schistosoma mansoni* (JAMES & GLAVEN., 1989), *Cryptococcus neoformans* (GRANGER et al., 1988) e *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992). Como previamente descrito, macrófagos ativados por IFN- γ inibem significativamente a replicação intracelular de parasitas e esta inibição é correlatada com os níveis de NO produzidos. (SILVA et al., 1995).

Nossos resultados indicam um aumento significativo da produção de NO pelas células peritoneais dos animais infectados utilizados no estudo que foram

tratados com meloxicam ou associação meloxicam/melatonina, ao longo da infecção. Os animais infectados que receberam o tratamento com somente melatonina não apresentaram aumento significativo nos níveis de Nitrito (NO_2^-), quando comparados com o grupo infectado controle, durante o curso da infecção. Além disso, diferenças significativas ocorreram entre os animais que foram tratados com melatonina e os animais submetidos ao tratamento com a associação de ambas as substâncias, [#] $P < 0,05$ - IT(Mel + Mx) vs IT(Mel) - (7°, 14°, and 21°) dias pós infecção - Tabela 2.

De acordo com (BORGES et al., 1998; PINGE-FILHO et al., 1999), dois dos mecanismos envolvidos na imunossupressão de fase aguda da doença de Chagas seriam: aumento excessivo da produção de NO e níveis altos de PGE_2 durante a infecção pelo parasita, sendo que a PGE_2 direcionaria as respostas imunológicas do hospedeiro no sentido da produção de citocinas padrão Th-2 através de sua ação em clones Th0 (FREIRE DE LIMA et al., 2000). Nossos resultados estão parcialmente de acordo com estes autores, uma vez que os níveis de NO_2^- tendem a aumentar em nosso modelo experimental, porém, não foram suficientes para causar a morte dos animais. Segundo (UZ T & MANEV H., 1998; ZHANG H et al., 1999), a melatonina apresenta uma importante função antioxidante, atuando indiretamente na regulação de enzimas pró-oxidativas, em particular 5 e 12 lipoxigenases e óxido nítrico sintase (POZO et al., 1994; STORR et al., 2002). Em nosso modelo experimental, podemos supor que a ativação da produção de citocinas do grupo Th-1 e a produção de óxido nítrico prevalecem sobre as propriedades antioxidantes da melatonina, o que poderia explicar a tendência da produção de níveis mais altos de NO_2^- pelas células peritoneais dos animais utilizados no estudo.

Nós observamos também que os parâmetros imunológicos analisados no estudo, tais como, TNF- α e INF- γ , alcançaram os valores mais baixos no 21° após a infecção que pode ser correlacionado com a diminuição da parasitemia. Nossos resultados referentes às concentrações de Nitrito (NO₂⁻) sugerem um aumento da atividade tripanossomicida por macrófagos ativados por IFN- γ durante todo o curso da infecção, principalmente nos animais tratados com meloxicam e meloxicam/melatonina, como demonstrado na figura 7 e tabela 2.

Com relação aos níveis de TNF- α , estes apresentam-se similares aos do grupo controle não infectado (NIC) no 21° dia de infecção, resultado este que pode estar relacionado com a baixa presença de tripomastigotas sanguíneos nos animais infectados neste período da infecção.

Alguns autores defendem a associação de TNF- α a macrófagos ativados por IFN- γ , apresentando-se como um segundo sinal relacionado à atividade microbicida destas células por estimulação da produção de NO em modelos infectados com *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii* (GREEN et al.,1990; LANGERMANS et al.,1992). De acordo com estes estudos, uma ação sinérgica desta citocina na ativação de macrófagos de camundongos infectados por *T. cruzi* foi demonstrada por (MUÑOZ-FERNANDEZ et al., 1992). Porém, tem sido demonstrado que o papel do TNF- α na infecção por *T. cruzi* é controverso, sendo que (GOLDEN & TARLETON., 1991) não confirmam as investigações acima. Os diferentes tratamentos utilizados em nosso modelo experimental não parecem alterar de forma significativa os níveis desta citocina.

Tipicamente, a infecção chagásica aguda é caracterizada por níveis aumentados de interleucinas do grupo Th-2, tais como, IL-4 e IL-10 (Reed et al.,

1994; Revelli et al., 1999). Além disso, há evidências na literatura que indicam que PGE_2 pode causar imunossupressão de maneira indireta, via um aumento na síntese dessas citocinas (Strassmann et al., 1994). Nossos resultados estão de acordo com estes autores, sendo que os diferentes tratamentos tendem a diminuir significativamente os níveis destas interleucinas. Estes dados reforçam a idéia de que as substâncias utilizadas no estudo (melatonina, meloxicam e associação de ambas) podem conduzir a um balanço favorável de produção de citocinas importantes na proteção do hospedeiro acometido pela infecção chagásica aguda, diminuindo concomitantemente a síntese de citocinas supressoras padrão Th-2.

A proteção exercida pelas substâncias avaliadas pode ser atribuída ao estímulo da resposta inum dos animais experimentais, sendo estas substâncias, capazes de auxiliar na redução do parasitismo tecidual cardíaco avaliado na fase aguda da doença. Nós sugerimos que tal fato poderá possivelmente conduzir a uma redução dos danos teciduais cardíacos durante a fase crônica da infecção, sendo necessários estudos posteriores a cronificação da doença que comprovem esta hipótese.

Estes resultados corroboram com estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa relativo ao papel da melatonina como um imunomodulador na doença de Chagas, favorecendo a produção de citocinas pertencentes ao padrão Th1. O controle da replicação parasitária mostrado neste estudo sugere uma nova alternativa terapêutica capaz de modular de maneira recíproca, mediadores inflamatórios e citocinas como IL-2 PGE_2 , IFN- γ , NO, IL-4 e IL-10, principalmente através da combinação de ambas as substâncias testadas. Tabela 4.

7 - CONCLUSÃO

Determinamos através destes resultados parciais, o perfil imune de nossos grupos experimentais tratados ou não pelos diferentes esquemas terapêuticos e infectados ou não pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, sendo estudado como objetivo complementar, a produção de Nitrito pelas células peritoneais dos animais que compõem nosso grupo experimental. Considerado como um importante parâmetro neste trabalho, a quantificação de nitrito permite uma avaliação indireta da produção de NO que está relacionado à atividade tripanossomicida de macrófagos ativados por INF- γ .

A análise da produção de prostaglandina E₂ pode ser considerada neste estudo como um ensaio chave que poderá auxiliar a estabelecer mecanismos alternativos de tratamento na infecção chagásica aguda através de um melhor entendimento das respostas imunológicas anti-*T cruzi*. Estes dados, somados os níveis de citocinas padrão Th-2: IL-4 e IL-10 e aos resultados referentes à parasitemia sanguínea e cardíaca sugerem informações importantes na modulação do perfil imune de ratos *Wistar* machos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da doença.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, G.K., FARIA, G.E.L., SILVA, K.T., CASTRO, E.C.C., REIS, M.A., MICHELIN, M.A. *Trypanosoma cruzi*: The role of PGE₂ in immune response during the acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology.**, United States, v.118, p. 514–521, 2008.

ABRAHAMSOHN, I.A; COVMAN, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology.**, United States, v.155, p. 3955–3963, 1995.

ADAMS, L., J. H. HIBBS, R. R. TAINTOR, AND J. L. KRAHENBUHL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J. Immunol.**, United States, v.144, p.2725–2729, 1990.

ANGELI, A; GATTI, G; SARTORI, M.L; DEL PONTE, D; CARIGNOLA, R. Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. **Neuroendocrinol. Lett.**, Sweden, v. 9, p. 286, 1987.

ASSREUY, J., F. Q. CUNHA, M. EPPERLEIN, A. NORONHA-DUTRA, C. A. O'DONNELL, F. Y. LIEW, AND S. MONCADA. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, Germany, v.24, p.672–676, 1994.

BECKER-ANDRE, M; WIESENBERG, I; SCHAEAREN-WIEMERS, N; ANDRE, E; MISSBACH, M; SAURAT, J.H; CARLBERG, C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily., **J Biol Chem.**, United States, v. 269, p. 28531–28534, 1994.

BETZ, M., AND FOX, B. S. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J. Immunol.**, United States, v. 146, p. 108, 1991.

BORGES, M.M; ANDRADE, S.G; PILATTI, C.G; PRADO JR, J.C; KLOETZEL, J.K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Brazil, v.87, p.493-502, 1992a.

BORGES, M.M; KLOETZEL, J.K; ANDRADE, H.F; TADAKORO, C.E; PINGE-FILHO, P; ABRAHAMSOHN, I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology Letters.**, Netherlands, v.63, p.1-8, 1998.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst Med Trop.**, Brazil, v. 4, p. 389-396, 1962.

CARDILLO, F; VOLTARELLI, J.C; REED, S.G; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infection and Immunity.**, United States, v.64. p.128-134, 1996.

CARRILLO-VICO, A; GARCÍA-MAURIÑO, S; CALVO J.R; GUERRERO J.M. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE₂ on IL-2 production in human lymphocytes via its mtl membrane receptor. **FASEB J.**, United States, v.17, p.755-757, 2003.

CARRILLO-VICO A, GUERRERO JM, LARDONE PJ ET AL. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine.**, United States, v.27, p.189-200, 2005.

CASTRO MAP, BRENER Z. Estudo parasitológico e anátomopatológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas de *T. cruzi*. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Brazil, v.18 p. 233-239, 1985.

CILLARI, E; LIEW, F.Y; LELCHUK, R; Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with *Leishmania major*. **Infection and Immunity.**, United States, v.54, p.386-394, 1986.

CLAUSTRAT, B.B.J; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev.**, England, v. 9, p.11-24, 2005.

DEL GOBBO, V; LIBRI, V; VILLANI, N; CALIO, R; NISTICO. G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. **Int J Immunopharmacol.**, England, v.11, p.567-573, 1989.

DING, A. H., C. F. NATHAN, AND D. J. STUEHR. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, United States, p.141-2407, 1988.

DUBOCOVICH, M. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? **Trends Pharmacol. Sci.**, England, v.16, p.50-56, 1995.

DUBOCOVICH, M.L; RIVERA-BERMUDEZ, M.A; GERDIN, M.J; MASANA MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Front Biosci.**, United States, v.8, p.1093-1108, 2003.

ENGELHARDT, G; BOGEL, R; SCHNITZER, C; UTZMANN, R. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part 1. In vitro findings. **Biochemistry and Pharmacology.**, England, v.51, p.21-28, 1996.

FIERRO, I.M; NASCIMENTO-DA-SILVA, V; ARRUDA, M.A; FREITAS, M.S; PLOTKOWSKI, M.C; CUNHA, F.Q; BARJA-FIDALGO, C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. **Journal of Leukocyte Biology.**, United States, v. 65, p.508-514, 1999.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Oxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica Brasileira.**, Brazil, v.46, p. 265-71, 2000.

FRASCHINI, F; FERIOLI, M.E; NEBULONI, R; SCALABRINO, G. Pineal gland and polyamines. **J. Neural Transm.**, Austria, v.48, p.209-221, 1980.

FREIRE-DE-LIMA, C.G; NASCIMENTO, D.O; SOARES, M.B.P; BOZZA, P.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; MELLO, F.G; DOS REIS, G.A; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature.**, England, v.403, p.199-203, 2000.

GALVÃO DA SILVA, A.P; JACYSYN, J.F; ABRAHAMSOHN, I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology.**, England, v.108, p.230–237, 2003.

GARCIA-MAURIÑO, S; POZO, D; CALVO, J. R; AND GUERRERO, J. M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. **J. Pineal Res.**, Denmark ,v.29, p.129-137, 2000.

GARCÍA-MAURIÑO, S; POZO, D; CARRILLO-VICO, A; CALVO, J. R; AND GUERRERO, J. M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. **Life Sci.**, England, v.65, p.2143-2150, 1999.

GARCIA-MAURIÑO, S., GONZALEZ-HABA, M. G., CALVO, J. R., GOBERNA, R., AND GUERRERO, J. M. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. **J. Neuroimmunol.**, Netherlands, v.92, p. 76-84, 1998.

GARCÍA-MAURIÑO, S; GONZALEZ-HABA, M.G; CALVO, J.R; RAFII-EL-IDRISSI, M, SANCHEZ-MARGALET; V, GOBERNA; R, GUERRERO J.M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- γ production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J Immunol.**, United States, v.159, p.574-581, 1997.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming grow factor-beta. **Eur J Immunol.**, Germany, v.22, p.2501-2506, 1992.

GAZZINELLI, R. T., I. P. OSWALD, S. L. JAMES, AND A. SHER. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN-g-activated macrophages. **J. Immunol.**, United States, v. 148, p.1792–1796, 1992.

GOLDEN, J. M., AND R. L. TARLETON. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.**, United States, v.72, p.391–402, 1991.

GRANGER, D. L., J. B. HIBBS, J. R. PERFECT, AND D. T. DURACK. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. **J. Clin. Invest.**, United States, v. 81, p.1129–1136, 1988.

GREEN, S. J., R. M. CRAWFORD, J. T. HOCKMEYER, M. S. MELTZER, AND C. A. NACY. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-g-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-a. **J. Immunol.**, United States, v. 145, p.4290–4297, 1990.

GRISWOLD, D. E; ADAMS, J. L. constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2); rationale for selective inhibition and progress to date. **Med Res Rev.**, United States, v.16, p.181-206, 1996.

GUERRERO, J.M; REITER, R.J. Melatonin-Immune System Relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry.**, Netherlands, v.2, p.167-179, 2002.

HARDELAND, R & PANDI-PERUMAL, S.R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. **Nutr Metab.**, Switzerland, v.2, p.22, 2005.

HERSCHMAN, H.R. Prostaglandin synthase 2. **Biochimistry Biophysic Acta.**, Netherlands, v.1299, p.125-140, 1996.

HOFT, D.F; SCHNAPP, A.R; EICKHOFF, C.S; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4 (+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immunology.**, United States, v.68, p.197-204, 2000.

HOLSCHER, C., KOHLER ,G., MULLER ,U., MOSSMANN, H., SCHAUB, G. A., BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**., United States, v.66, p.1208–1215, 1998.

JAMES, S. L., AND J. GLAVEN. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **J. Immunol.**, United States, v.143, p.4208–4212, 1989.

JANKOVIC, B.D; ISAKOVIC, K; PETROVIC, S. Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. **Immunology**., England, v.18 p.1-6, 1970.

KANG, J; AHN, M; KIM, Y, et al. Melatonin ameliorates autoimmune encephalomyelitis through supression of intercellular adhesion molecule-1. **J. Vet. Sci.**, Korea (South), v. 2, p. 85-89, 2001.

KATAMURA, K; SHINTAKU, N; YORIKO, Y; FUKUI, T; OHSHIMA, Y; MAYUMI, M; FURUSHO, K. Prostaglandin E2 priming of naïve CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN- γ and IL-2, but not IL-4 and IL-5. **Journal of Immunology**., United States, v.155, p.4604-4612, 1995.

LANGERMANS, J. A. M., M. E. B. VAN DER HULST, P. H. NIBBERING, P. S. HIEMSTRA, L. FRANSEN, AND R. VAN FURTH. IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . **J. Immunol.**, United States, v.148, p.568–574, 1992.

LERNER, A.B; CASE, J.D; TAKAHASHI, Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. **J Biol Chem.**, United States, v.235, p.1992-1997, 1960.

LIEW, F.Y; MILLOTT, S; PARKINSON, C; PALMER, R.M; MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology.**, United States, v.144, p.4794-4797, 1990.

LISSONI, P; MARELLI, O; MAURI, R; RESENTINI, M; FRANCO, P; ESPOSTI, D; ESPOSTI, G; FRASCHINI, F; HALBERG, F; SOTHERN, R; CORNÉLISSEN, G. Ultradian chronomodulation by melatonin of a placebo effect upon human killer cell activity. **Chronobiologia.**, Italy ,v.13, p.339-343, 1986.

MAESTRONI, G. J; CONTI, A; AND PIERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. **J. Neuroimmunol.**, Netherlands, v.13, p.19-30, 1986.

MICHELIN, M.A; FIGUEIREDO, F; CUNHA, F.Q. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Parasitology.**, United States, v.102, p.170-177, 2002.

MICHELIN, M.A; SILVA, J.S; CUNHA, F.Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental parasitology.**, United States, v.111, p.71-79, 2005.

MIRALLES MJ, MCGINITY JW, MARTIN A. Combined water-soluble carriers for coprecipitates of tolbutamide. **J Pharm Sci.**, United States, v.71, p.302–304; 1982.

MOCHEGANI, E; BULIAN, D; SANTARELLI, L; TIBALDI, A; MUZZIOLO, M; LESNIKOV, V; PIERPAOLI, W; FABRIS, N. The zinc pool is involved in the immune-reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, United States, v.19, p.630-637, 1996.

MUÑOZ-FERNANDEZ, M., M. A. FERNANDEZ, AND M. FRESNO. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.**, Germany, v.22, p.301–307, 1992.

NELSON, R. J; AND DRAZEN, D. L. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, United States, v.917, p.404-415, 2000.

NICKELL, S.P; KEANE, M. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4⁺ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. **Infection and Immunity.**, United States, v.4, p.3250-3258, 1993.

PINGE-FILHO, P; TADOKORO, C.E; ABRAHAMSOHN, I.A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology.**, United States, v.193 (1), p.90-98, 1999.

PIOLI, C; CAROLEO, M.C; NISTICO, G; DORIA, G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. **Int. J. Immunopharmacol.**, England, v.15, p.463-468, 1993.

POZO, D; REITER, R.J; CALVO, JR & GUERRERO, J.M. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. **Life Sci.**, England, v.55, p.455-460, 1994.

REED, S.G; BROWNELL, C.E; RUSSO, D.M; SILVA, J.S; GRABSTEIN, K.H; MORRISSEY, P.J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology.**, United States, v.153, p.3135-3140, 1994.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, United States, v. 140, p. 4342–4347, 1988.

REED, S.G; LARSON, C.L; SPEER, C.A. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas disease. **Zeitschrift fur Parasitenkunde.**, Germany, v.52, p.11-17, 1977.

REVELLI, S; GOMEZ, L; WIETZERBIN, J; BOTTASSO, O; BASOMBRIIO, M.A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4, 6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research.**, Germany, v.85, p.147–150, 1977.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R; RASSI, A; KÖBERLE, F. Chagas Disease. In: Schonfeld, H. (Ed.), **Antiparasitic Chemoterapy.**, S. Karger, Basel,. United States, p.115-134, 1991.

ROTTENBERG, M; LINDQVIST, C; KOMAN, E; SEGURA, L; ORN, A. Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology.**, England, v.30, p.65-72, 1989.

SANTELLO, F. H., FRARE, E. O., SANTOS, C. D., TOLDO, M. P. A., KAWASSE L. M., ZUCOLOTO. S., PRADO JR., J C. Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Pineal Research.**, Denmark, v. 42, p.359 – 363, 2007.

SANTOS, C.D; TOLDO, M.P.A; PRADO, JR, J.C. *Trypanosoma cruzi*: The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. **Act. Trop.**, Netherlands, v.95. p.109-115, 2005.

SCALABRINO, G; FERIOLI, M.E; NEBULONI, R; FRASCHINI, F. Effects of pinealectomy on the circadian rhythms of the activities of polyamine biosynthetic decarboxilases and tyrosine aminotransferase in different organs of the rat. **Endocrinology.**, United States, v.104, p.377-384, 1979.

SILVA, L.H.P & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folha Clínica Biol.**, Brazil, v.20, p. 191-201, 1953.

SILVA, J. S., D. TWARDZIK, AND S. G. REED. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor-beta. **J. Exp. Med.**, United States, v.174, p.539–545, 1991.

SILVA, J.S; VESPA, G.N; CARDOSO, M.A; ALIBERTI, J.C; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**., United States, v.63, p.4862-4867, 1995.

SILVA J.S., MACHADO F.S., MARTINS G.A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci.**, United States, v.8, p. 314-325, 2003.

SMITH, W.L; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **Advances in Immunology**., United States , v.62, p.167-215, 1996.

SMYTH HF, CARPENTER CP, WEIL CS. The toxicology of the polyethylene glycols. **J Am Pharm Assoc (Sci)**., United States, v.39, p.349–354, 1950.

STORR, M; KOPPITZ, P; SIBAEV, A; SAUR, D; KURJAK, M; FRANCK, H; SCHUSDZIARRA, V & ALLESCHER H.D. Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. **J Pineal Res.**, Denmark, v.33, p.101-108, 2002.

STRASSMANN, G., PATIL-KOOTA, V., FINKELMAN, F., FONG, M., KAMBAYAH, T.,
Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine
peritoneal macrophages by prostaglandin E2. **Journal of Experimental Medicine.**, United
States, v.180, p.2365– 2370, 1994.

TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence
for a role for suppressor cells. **Journal of Immunology.**, United States, v.140, p.2769-2773,
1988.

TEGEDER, I; PFEILSCHIFTER, J; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-independent
actions of cyclooxygenase inhibitors. **The FASEB Journal.**, United States, v.15, p.2057-
2072, 2001.

TORRICO, F; HEREMANS, H; RIVERA, M.T; VAN, M.E; BILLIAU, A; CARLIER, Y.
Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in
mice. **Journal of Immunology.**, United States, v.146, p.3626-3632,1991.

UZ, T & MANEV, H. Circadian expression of pineal 5-lipoxygenase mRNA. **Neuroreport.**,
England, v.9, p.783-786, 1998.

VANE, J. R; BOTTING, R. M. Overview – mechanisms of action of anti-inflammatory
drugs. **Kluwer Academic Publishers**, England., v.1, p.1-27, 1996.

WALKER, C; KRISTENSEN, F; BETTENS, F; DEWECK, A.L. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. **Journal of Immunology.**, United States, v.130, p.1770-1773, 1983.

WIESENBERG, I; MISSBACH, M; KAHLEN, J; SCHRADER, M; AND CARLBERG, C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. **Nucleic Acids Res.**, England, v.23, p.327-333, 1995.

WHO. **Control of Chagas Disease.** Report of WHO Expert Committee, WHO Technical Report v. 811, Swiss, p. 95, 2003.

ZHANG, H; AKBAR, M & KIM, H.Y. Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. **Biochem J.**, England, v.344, p.487-493, 1999.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.347.53.0) intitulado "Salicilato de Sódio e Melatonina: Teriam uma ação sinérgica durante a fase aguda da infecção experimental por *T. curzi*?" de autoria de **Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado em reunião da CEUA de 03.07.07.

Ribeirão Preto, 4 de julho de 2007

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro