UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da administração de melatonina sobre a resposta imune em
ratos *Wistar* na amebíase hepática**

Vania Fernandez

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da administração de melatonina sobre a resposta imune em
ratos *Wistar* na amebíase hepática**

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientada: Vania Fernandez

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do
Prado Júnior

***Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 04/10/2012. A versão original
encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP*.**

Ribeirão Preto

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandez, Vania

Efeitos da administração de melatonina sobre a resposta imune em ratos *Wistar* na amebíase hepática. Ribeirão Preto, 2012.

53 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Prado Jr., José Clóvis.

1. Melatonina 2. Amebíase Hepática.
3. *Entamoeba histolytica*. 4. Resposta Imune.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vania Fernandez

Efeitos da administração de melatonina sobre a resposta imune em ratos *Wistar* na amebíase hepática

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

Dedico este trabalho

Aos meus queridos e muito amados pais (in memoriam):

Marlene Therezinha da Silva Fernandez

Wilson Fernandez

que sonharam , lutaram muito e nos ensinaram o valor do conhecimento.

A minha gratidão e saudade!

Ao meu querido e também muito amado irmão:

João Marcos Fernandez, pelo estímulo, carinho e amizade em todas as horas.

A Deus por me dar forças, proteção e saúde para superar as dificuldades da vida. Sem Ele nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Para a elaboração deste trabalho contamos com a participação de várias pessoas a quem gostaríamos de fazer os nossos mais profundos agradecimentos,

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior, com carinho e gratidão, pela orientação, oportunidade oferecida e confiança em meu potencial para a realização deste projeto.

À Prof^a Dra. Isis do Carmo Kettelhut, chefe do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, pela amizade, carinho, humanidade e com a minha gratidão pelo inestimável apoio para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr João Santana da Silva, meu chefe imediato e vice-chefe do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP, pela amizade, carinho e também com a minha gratidão pela oportunidade imprescindível de finalização deste trabalho.

À Prof^a Dra Ana Amélia Carraro Abrahão, pela colaboração neste trabalho, carinho e amizade no dia a dia do laboratório.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pela amizade e liberação do laboratório desde o início para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr Edward Félix da Silva da UFMG, por me abrir as portas do seu laboratório e por transmitir os conhecimentos necessários que muito me auxiliaram na elaboração deste projeto.

Ao João da Costa Viana (Joãozinho) da UFMG, pela imprescindível colaboração, amizade e sobretudo apoio técnico me fornecendo as cepas de *Entamoeba histolytica*.

Ao José Carlos Vanni, pela amizade e apoio técnico impecável nos longos e trabalhosos dias de experimentos cirúrgicos.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia da FCFRP : Míriam Paula Alonso Toldo, Georgius Luiz de Oliveira, Inara Gallo, Antônia Ferreira Cruz e Cristiana González pelo apoio técnico e amizade.

Aos pós-graduandos do laboratório de Parasitologia da FCFRP: Christian Collins Kuhen, Luís Gustavo Rodrigues, Marina Del Vecchio Filipin, Vânia Brazão, Fabrícia Helena Santello, Mariana Bronzon, Mariana Rosa da Silva, Kelly Cristina Rodrigues pela amizade e em especial para Carla Domingues dos Santos Sponchiado, pela importante colaboração em experimentos.

Aos meus familiares: Maria Cristina Fernandez, Ângela Fernandez Collucci, Dirce Ferriolli, Tacila de Paula Ferriolli, Otacílio Antônio Ferriolli, Eliara de Paula Ferriolli, Gustavo Ferriolli, Lizandra Escoura Canini, Regina Gando, Eduardo Gando e a todos os outros pelo estímulo, amizade e carinho.

Às minhas amigas, que sempre me incentivaram, e companheiras de todos os momentos: Maria Enes Dutra, Rosangela Cristóvão Ferreira, Lúcia Vitali pela amizade que é um dos pilares do ser humano.

À Marilurdes Misson Godoy (Lú), pelo grande incentivo, amizade e força durante a elaboração desta dissertação.

À Vânia Cláudia de Albuquerque, amiga de tantos anos, sempre carinhosa e solícita pela ajuda nas traduções para o espanhol do meu resumo.

À Fabiana Rosseto, pela excelência técnica ao realizar as citometrias.

Aos funcionários da pós graduação da FCFRP: Henrique Theodoro, Rosana Ferreira L.S. Florêncio pela dedicação e profissionalismo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por fornecer estrutura física e humana de excelência na minha graduação e mestrado.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP , onde passei boa parte de minha vida, e que me proporciona estrutura tanto profissional quanto humana de primeira qualidade, sendo motivo de orgulho para mim, fazer parte desta importante unidade.

"Caminhos "

*Tem sempre presente
que a pele se enrugua,
o cabelo se torna branco,
que os dias se convertem em anos,
mas o mais importante não muda!*

*Tua força interior e tuas convicções não têm idade.
Teu espírito é o espanador de qualquer teia de aranha.
Atrás de cada linha de chegada, há uma de partida.
Atrás de cada triunfo, há outro desafio.
Enquanto estiveres vivo, sente-te vivo.
Se sentes saudades do que fazias, torna a fazê-lo.
Não vivas de fotografias amareladas.
Continua, apesar de todos esperarem que abandones.
Não deixes que se enferruje o ferro que há em você.
Faz com que em lugar de pena, te respeitem.
Quando pelos anos não consigas correr, trota.
Quando não possas trotar, caminha.
Quando não possas caminhar, usa bengala.
Mas nunca te detenhas!*

" Madre Teresa de Calcutá "

RESUMO

FERNANDEZ, V. **Efeitos da administração de melatonina sobre a resposta imune em ratos Wistar na amebíase hepática.** 2012. 53f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Os trofozoítos de *Entamoeba histolytica* após se evadirem de uma complexa resposta imune ao nível da mucosa intestinal, invadem o epitélio, podendo disseminar-se pela circulação portal, atingindo o fígado e outros órgãos. A amebíase hepática é a forma mais comum de amebíase extraintestinal e corresponde a menos de 1% dos casos clínicos de amebíase. A modulação das respostas imunológicas frente à administração de substâncias farmacologicamente ativas em modelos experimentais infectados por diferentes patógenos tem contribuído de maneira importante nas investigações de terapias alternativas para colaborar no tratamento das diferentes doenças parasitárias. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina cuja síntese ocorre na glândula pineal e em vários locais extrapineais, como, as células do sistema imune, retina, medula óssea, pele, leucócitos, e trato gastrointestinal. É uma molécula pleiotrópica que possui atividades imunoestimulatórias e efeitos pró e anti-inflamatórios. O presente estudo teve como objetivo avaliar um possível efeito imunomodulatório subsequente à administração oral de melatonina em ratos da linhagem Wistar machos infectados no fígado pela cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica* na fase aguda da amebíase hepática experimental. Foram utilizados vários parâmetros como: dosagens das citocinas IFN- γ , IL-4, análise por citometria de fluxo das populações celulares TCD3+, TCD4+, TCD8+, CD45+, CD161+ e produção de óxido nítrico. Através dos resultados obtidos, podemos concluir que a melatonina exerceu seus efeitos imunomodulatórios, ora induzindo uma resposta imune mais eficaz de forma a minimizar os efeitos patogênicos da infecção ao mesmo tempo em que exerceu um papel anti-inflamatório na tentativa de manter a homeostase imunológica do hospedeiro, evitando uma exacerbação dessas respostas que certamente iriam influenciar o grau de patogenicidade desta parasitose.

Palavras chave: Melatonina, *Entamoeba histolytica*, amebíase hepática, ensaios imunológicos

ABSTRACT

FERNANDEZ, V. **Effects of melatonin administration on the immune response of *Wistar* rats in amebic liver abscess**. 2012. 53f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The trophozoites of *Entamoeba histolytica* after evade a complex immune response at the intestinal mucosal level, invade the epithelial layer and may spread into the portal circulation reaching the liver and other organs. The amoebic liver abscess (ALA) is the most common form of the extraintestinal amebiasis and is less than 1% of clinical cases of human amebiasis. The modulation of immune responses by the administration of pharmacological active substances in experimental models infected by different pathogens has contributed in investigations of alternative therapies in order to aid the treatment of various parasitic diseases. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an indolamine whose synthesis occurs in the pineal gland and in several extra-pineal locations such as the immune system cells, retina, bone marrow, skin, leukocytes, and gastrointestinal tract. This molecule has pleiotropic effects with immunoenhancing actions besides pro and anti inflammatory effects. The present study aimed to evaluate a possible immunomodulatory effect following the oral administration of melatonin in male *Wistar* rats infected with the strain HM1-IMSS of *E. histolytica* during the acute phase of experimental amebic liver abscess. Several immune parameters were evaluated such as of cytokines IFN- γ , IL-4, flow cytometry analysis of cell populations TCD3+, TCD4+, TCD8+, CD45+, CD161+, and nitric oxide production. According to our results, we can conclude that melatonin exerted its immunomodulatory actions, once triggering a more accurate host's immune response reducing the pathogenic effects from the infection and at the same time, exerting an anti-inflammatory role in the attempt to control host's immune homeostasis, avoiding an exacerbation of these responses that would certainly influence the degree of pathogenicity of this parasitosis.

Key words: Melatonin, *Entamoeba histolytica*, amebic liver abscess, immunological assays.

RESUMEN

FERNANDEZ, V. **Los efectos de la administración de la melatonina sobre la respuesta inmune en ratas Wistar en la amebiasis hepática.** 2012 53f. Tesis (Maestría)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* después de evadir de una compleja respuesta inmune al nivel de la mucosa intestinal, invaden el epitelio, pudiendo diseminarse por la circulación portal, atingiendo el hígado y otros órganos. La amebiasis hepática es la forma más común de amebiasis extra intestinal y corresponde a menos de 1% de los casos clínicos de amebiasis. La modulación de las respuestas inmunológicas frente a la administración de sustancias farmacológicamente activas en modelos experimentales infectados por diferentes patógenos ha contribuido de manera importante en las investigaciones de terapias alternativas para colaborar en el tratamiento de las diferentes enfermedades parasitarias. La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina cuya síntesis ocurre en la glándula pineal y en varios locales extra pineales como las células del sistema inmune, retina, médula ósea, piel, leucocitos y trato gastrointestinal. Es una molécula pleiotrópica que posee actividades immunoestimuladoras y efectos pro y anti-inflamatorios. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar un posible efecto inmunomodulatorio subsecuente a la administración oral de melatonina en ratas del linaje Wistar machos infectadas en el hígado por la cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica* en la fase aguda de la amebiasis hepática experimental. Fueron utilizados varios parámetros como: dosaje de las citoquinas IFN- γ , IL-4, análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares TCD3+, TCD4+, TCD8+, CD45+, CD161+ y producción de óxido nítrico. Por medio de los resultados obtenidos, pudimos concluir que la melatonina ejerció sus efectos inmunomodulatorios, por veces induciendo una respuesta inmune más eficaz objetivando minimizar los efectos patogénicos de la infección mientras ejercía también la función antiinflamatoria, con el objetivo de mantener el homeostasis inmunológico del hospedero, evitando una exacerbación de esas respuestas que seguramente podrían influir en el nivel de patogenicidad de esta parasitosis.

Palabras clave: Melatonina, *Entamoeba histolytica*, amebiasis hepática, ensayos inmunológicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	4
Figura 2. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos TCD3+ no baço de ratos <i>Wistar</i> machos infectados ou não com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , no 6° dia após a infecção	23
Figura 3. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos TCD4+ no baço de ratos <i>Wistar</i> machos infectados ou não com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , no 6° dia após a infecção	24
Figura 4. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos TCD8+ no baço de ratos <i>Wistar</i> machos infectados ou não com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , no 6° dia após a infecção	25
Figura 5. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos CD45+ no baço de ratos <i>Wistar</i> machos infectados ou não com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , no 6° dia após a infecção	26
Figura 6. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos CD161+ no baço de ratos <i>Wistar</i> machos infectados ou não com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , no 6° dia após a infecção	27
Figura 7. Concentração de IL-4 em pg/ml em soro de ratos <i>Wistar</i> machos não infectados e infectados com 2×10^6 trofozoítos de <i>E.histolytica</i> coletados 6 dias após a infecção.....	28
Figura 8. Concentração de IFN- γ em pg/ml em soro de ratos <i>Wistar</i> machos não infectados e infectados com 2×10^6 trofozoítos de <i>E.histolytica</i> coletados 6 dias após a infecção.....	29
Figura 9. Concentração de NO (μ M) a partir de macrófagos peritoneais estimulados (A) ou não (B) com LPS (10 μ g/ml). Macrófagos foram coletados de ratos <i>Wistar</i> machos no sexto dia após a inoculação do fígado destes animais com $2,0 \times 10^6$ trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	Abscesso hepático amebiano
Con A	Concanavalina A
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina 4
LPS	Lipopolissacarídeos
NK	Natural killer
NO	Óxido Nítrico
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Amebíase	1
1.2 Amebíase Hepática - Sinais Clínicos	6
1.3 Amebíase hepática e Resposta Imune	7
1.4 Amebíase Hepática–Tratamento.....	11
1.5 Melatonina	12
1.6 Melatonina-Sistema Imune.....	14
2 OBJETIVO	16
3 JUSTIFICATIVA	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Cultura de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
4.3 Infecção	18
4.3.1 Inoculação de Fígado de Ratos com Cultura de <i>E.histolytica</i>	19
4.4 Grupos de Animais	19
4.5 Eutanásia e Coleta de Sangue.....	20
4.6 Dias de Experimento	20
4.7 Suplementação de Melatonina.....	20
4.8 Quantificação de Nitrito	20
4.9 Análise Fenotípica das Populações Celulares por Citofluorimetria de Fluxo	21
4.10 Dosagens de Citocinas:.....	22
4.10.1 Dosagens de IFN- γ e IL-4	22
4.11 Análise Estatística	22

5 RESULTADOS	23
5.1 Análise Fenotípica das Populações Celulares por Citofluorimetria de Fluxo	23
5.1.1 População Celular TCD3+	23
5.1.2 População Celular TCD4+	24
5.1.3 População Celular TCD8+	25
5.1.4 População Celular CD45+	26
5.1.5 População Celular CD161+	27
5.2 Dosagem de Citocinas	28
5.2.1 IL-4	28
5.2.2 IFN- γ	29
5.3 Dosagem de nitrito	30
 6 DISCUSSÃO	 32
 7 CONCLUSÕES.....	 37
 8 REFERÊNCIAS	 38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Amebíase

Amebíase é a doença causada pela infecção do ser humano com o parasita *Entamoeba histolytica*, protozoário que geralmente vive na luz do intestino grosso sem provocar sintomas, podendo se tornar invasivo causando ulcerações na mucosa intestinal que podem levar à colite amebiana e abscesso hepático amebiano (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1997).

A amebíase é definida pela presença de *E. histolytica* no homem, com ou sem sintomatologia clínica. A maioria dos indivíduos, que representam 90% dos portadores de *E. histolytica*, são assintomáticos não desenvolvendo a doença. É considerada a segunda causa de mortalidade por protozoários parasitas no mundo, superada apenas pela malária, podendo alcançar até 100 000 mortes por ano (WHO, 1997; WHO, 2010). Tem grande incidência em áreas com condições sanitárias e nutricionais precárias levando à alta morbidade e mortalidade nestas regiões. Walsh (1986), através de um levantamento de dados publicados sobre a prevalência da infecção humana por *E. histolytica*, estimou que 500 milhões de pessoas eram portadoras de *E. histolytica* no mundo, resultando em 50 milhões de casos clínicos intestinais ou extraintestinais. O resultado desta clássica referência foi que 10% da população mundial encontrava-se infectada com o parasita e 1% desenvolvia as formas clínicas invasivas intestinais como colite amebiana fulminante ou extraintestinais como abscesso hepático amebiano (AHA), potencialmente fatais (PETERSON et al., 2010; WHO, 1997; XIMÉNEZ et al., 2009).

A amebíase pode variar desde uma infecção assintomática até doença invasiva, que pode levar à amebíase intestinal ou extraintestinal e o curso desta doença e suas variações clínicas são dependentes de fatores como virulência da cepa e resposta imune do hospedeiro (WHO, 1985).

A amebíase intestinal é caracterizada pela invasão da mucosa intestinal ocasionando úlceras e colite amebiana e amebíase extraintestinal cuja disseminação através da corrente sanguínea atinge outros órgãos, principalmente o fígado causando abscessos hepáticos (GARCIA-ZEPEDA et al., 2007). Além deste órgão podemos ocasionalmente ter o comprometimento pulmonar, cerebral e de genitais com formação de abscessos amebianos (HAQUE et al., 2003; HUGHES; PETRI, 2000; WALSH, 1988).

Em 1925, Emile Brumpt baseando-se no fato de que a maioria dos indivíduos portadores de *E. histolytica* eram assintomáticos, postulou que possivelmente *E. histolytica* não era uma espécie única mas que existiam duas espécies, sendo uma patogênica chamada de *Entamoeba dysenteriae* (*E. histolytica* propriamente dita) e *Entamoeba dispar*, não patogênica (BRUMPT, 1925). Entretanto, sua hipótese não foi aceita por pesquisadores da época. Após isto, à partir de dados bioquímicos, imunológicos e genéticos acumulados em vários trabalhos científicos, em 1993 foi feita uma redescritção da *E. histolytica* distinguindo-a da *E. dispar*. Portanto, os dados epidemiológicos obtidos anteriormente a esta separação de espécies, podem ter sido superestimados com relação à frequência da infecção pela patogênica *E. histolytica* da não patogênica *E. dispar* (CLARK; DIAMOND, 1993).

Após a separação das espécies de *E. histolytica* e *E. dispar* ocorreu uma mudança na epidemiologia mundial da amebíase ficando os dados estatísticos não atualizados e incertos onde não foi considerada por exemplo, a contribuição de outras amebas como a *Entamoeba moshkovskii* que é outra espécie morfológicamente indistinguível das anteriormente citadas, não patogênica e presente em regiões endêmicas (TENGGU; NORHAYATI, 2011).

A amebíase ainda é considerada, um grande problema de saúde pública, principalmente em áreas com condições sanitárias, de saúde e sócio-econômicas precárias. Em países como México, Índia, África do Sul, alguns países das Américas Central e do Sul, e países da Ásia, a amebíase é endêmica. No Brasil não existem dados estatísticos seguros sobre a prevalência da doença e de suas formas clínicas (CUNHA et al, 1977; WHO, 1985; XIMÉNEZ et al., 2009).

Determinados grupos de pessoas apresentam sérios problemas clínicos em decorrência da amebíase tais como imunossuprimidos, homossexuais masculinos que se contaminam por sexo oral-anal, imigrantes ou viajantes de áreas endêmicas e indivíduos internados em instituições coletivas (PETRI, 1996).

No México, em um estudo soroepidemiológico, 8,41% da população mexicana estudada, tinha a presença de anticorpos circulantes para *E. histolytica*, mostrando a alta exposição dos mexicanos ao parasita e reafirmando a endemicidade da amebíase neste país (CABALLERO-SALCEDO et al., 1994).

Em países em desenvolvimento como Bangladesh, patógenos causadores de diarreias tanto bacterianas (principalmente por *Shigella*), como disenterias amebianas (pela *E. histolytica*), levam 1 a cada 30 crianças à morte até os 5 anos de idade. Em países desenvolvidos, a principal preocupação é com o uso destes microrganismos como bioagentes terroristas (KOTLOFF, 1999; PETRI et al., 2000).

No Brasil, a infecção por *E. histolytica* tem alta prevalência em alguns estados principalmente na região Amazônica, atingindo aproximadamente 30% da população da região metropolitana de Belém e 7% da população de Manaus. No nordeste, em Fortaleza cerca de 15% da população com baixas condições econômicas está infectada com o parasita (BENETTON et al., 2005; BRAGA et al., 2001; SILVA et al., 2005). Nos estados de Minas Gerais (Belo Horizonte), Pernambuco (Recife) e na Bahia (Salvador) não foram detectadas *E. histolytica* mas sim *E. dispar*, que não é patogênica, sendo morfológicamente indistinguíveis (OLIVEIRA-COSTA et al., 2006; SANTOS, 2007). Apesar de no Brasil não existirem relatórios nacionais, a amebíase hepática é mais incidente na região norte do que na região sul, onde não é comum (MANESCHY, 1974; REY, 1991).

Os cistos são a forma de resistência e infectante e os trofozoítos a forma móvel e invasiva do parasita (ARIAS-NEGRETE; CHADEE, 1996; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTINEZ-PALOMO, 2000). Os hospedeiros naturais são o homem e a principal fonte de infecção se dá pela ingestão de cistos infectantes através de água ou alimentos contaminados por fezes de pacientes crônicos ou portadores assintomáticos (SILVA; GOMES, 2005).

A *E. histolytica* tem um ciclo de vida simples, monoxênico, passando por vários estágios que são: trofozoítos, cistos, pré-cistos e metacistos. Os cistos maduros são tetranucleados e resistentes à acidez estomacal. Sofrem desencistamento no lúmen do intestino delgado, com a saída do metacisto através de uma fenda na parede cística que sofre sucessivas divisões nucleares, seguidas por divisões citoplasmáticas, dando origem a oito trofozoítos. Geralmente, migram para o intestino grosso, onde ficam no lúmen e aderem ao muco do cólon e camadas epiteliais vivendo como um comensal, satisfazendo suas necessidades energéticas pela ingestão de microflora local e nutrientes do hospedeiro (SILVA; GOMES, 2005). Os trofozoítos podem colonizar e/ou invadir o intestino grosso e os cistos nunca invadem os tecidos. Os trofozoítos são pleomórficos, móveis e se multiplicam por divisão binária. Os trofozoítos podem também se desprender da mucosa e, por circunstâncias ainda desconhecidas se reencistar no lúmen do cólon, primeiro pela desidratação que ocorre no seu citoplasma formando pré-cistos, e após pela secreção de membrana cística transformando-se em cistos, que serão eliminados pelas fezes perpetuando assim o ciclo de vida através da disseminação oral-fecal (SILVA; GOMES, 2005; PETRI, 1996; REEVES, 1984).

Figura 1. Ciclo de Vida de *Entamoeba histolytica*.

Fonte: modificado de Haque et al. (2003)

Na maioria das vezes, os trofozoítos se ligam ao muco e às células epiteliais sem penetrar na mucosa, não causando qualquer sintoma como ocorre com a infecção com *E.*

díspar, não patogênica. Por razões desconhecidas, os trofozoítos aderem ao epitélio do cólon, através da lectina Galactose e N-acetil Galactosamina (Gal/GalNAc). A lectina Galactose e N-acetil Galactosamina (Gal/GalNAc) é uma adesina da superfície amebiana que se liga à oligossacarídeos das células alvo do hospedeiro (CHADEE et al., 1987) podendo invadir o cólon. Esta invasão depende da liberação das cisteínas proteases, amebaporos, colagenases, fosfatases ácidas e de enzimas hidrolíticas que favorecem a progressão da doença nos tecidos causando colite amebiana (ACKERS; MIRELMAN, 2006; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). Em indivíduos que desenvolvem a doença invasiva, a adesão do parasita ao muco do cólon através da lectina Gal/GalNAc, é a etapa prévia ou pré requisito, para a penetração da barreira de muco e o contato direto com o epitélio (MONCADA et al., 2003).

As cisteínas proteinases (EhCPs) são secretadas por *E. histolytica* e parecem ter um papel no rompimento do muco intestinal, alterando a polimerização de mucina (MUC2), que é uma glicoproteína, considerada como o principal componente do muco que cobre o cólon humano e é degradada se tornando menos eficiente para impedir a adesão das células amebianas às do hospedeiro *in vitro* (MONCADA et al., 2003).

O processo invasivo se inicia após a adesão dos trofozoítos, e seus mecanismos ainda não estão completamente conhecidos. A adesão parece envolver várias moléculas como os amebaporos que são pequenos peptídeos que se inserem na camada bilipídica, rompendo a barreira da mucosa epitelial originando uma porta de entrada na célula hospedeira (LEIPPE, 1997). Os amebaporos podem levar células epiteliais e leucócitos à necrose (BERNINGHAUSEN; LEIPPE, 1997).

A invasão é seguida por um processo inflamatório agudo que recruta neutrófilos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos e linfócitos, os quais causam danos teciduais pela liberação de seus produtos tóxicos (OLIVOS-GARCIA et al., 2004).

Assim, é provável que com a degradação do muco *in vivo*, a invasão ocorra pelo contato dos parasitas com as células epiteliais e polimorfonucleares, causando a lise das mesmas, com a formação de úlceras e colite amebiana após a invasão. Os trofozoítos migram pela lâmina própria e submucosa antes de se disseminar principalmente para o fígado, causando abscesso hepático amebiano que pode levar à morte se não for tratado (CAMPBELL; CHADEE, 1997; PETRI et al., 2002).

A colite amebiana ocorre com a invasão da mucosa e submucosa intestinal. A extensão lateral através da submucosa ao longo do eixo intestinal origina a formação de uma úlcera

típica em forma de frasco com pescoço estreito e base larga, característica clássica da amebíase (MEZA, 2000).

Na amebíase intestinal invasiva, ocorrem praticamente quatro formas clínicas graves que são: disenteria ou diarreia com sangue, colite fulminante, apendicite amebiana e ameboma do cólon. Diarreia aguda e disenteria representam 90% dos casos (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTINEZ-PALOMO, 2000).

Colite amebiana é rara e quando se desenvolve é de forma gradual levando semanas para o total desenvolvimento. Pacientes com colite amebiana frequentemente têm múltiplas lesões discretas em estágios variados, cujos sintomas mais comuns compreendem desconforto de leve a moderado com presença de fezes aquosas contendo quantidades variáveis de sangue e muco (ADAMS; MACLEOD, 1977).

1.2 Amebíase Hepática - Sinais Clínicos

Os trofozoítos presentes na submucosa intestinal após invadirem o epitélio, podem disseminar-se pela circulação portal, atingindo o fígado e causando AHA, que é a forma mais comum de amebíase extraintestinal e corresponde a menos de 1% dos casos clínicos de amebíase. Além do fígado, onde é dez vezes mais frequente em adultos do que em crianças e três vezes mais em homens do que em mulheres, a amebíase extraintestinal pode atingir vários órgãos como pulmão, rim, cérebro ou pele (HAQUE et al., 2003; SEPÚLVEDA; TREVINO-GARCÍA MANZO, 1986; VELAZQUEZ et al., 1998).

No fígado, a infecção amebiana origina múltiplos granulomas que aumentam em tamanho e se fundem formando um grande e único abscesso (CHADEE; MEEROVITCH, 1984). O fígado se apresenta palpável, liso e macio (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTINEZ-PALOMO, 2000).

Os sintomas iniciais da amebíase hepática são súbitos com dores no hipocôndrio direito irradiando para área escapular e ombro direito, aumentando com respiração profunda, tosse e em caminhadas ao pisar com o pé direito. Outros sinais clínicos são anorexia, náuseas, vômitos, diarreia com ou sem sangue e disenteria e ao exame físico, hepatomegalia dolorosa. Os pacientes podem estar ictericos e as complicações da doença são perfuração para o espaço pericárdico, pleura ou cavidade peritoneal (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTINEZ-PALOMO, 2000).

Os pacientes com amebíase hepática são classificados em agudos (≤ 10 dias de duração dos sintomas) e crônicos (≥ 2 semanas de duração dos sintomas) com sintomas

clínicos variáveis. Febres altas, calafrios, sensibilidade abdominal difusa e um fígado doloroso caracterizam a fase aguda, com pacientes mais doentes enquanto que na fase crônica os sintomas são mais leves, fígado aumentado, liso e macio. Na amebíase hepática aguda, lesões únicas no lobo direito do fígado são vistas na mesma proporção que as múltiplas, com abscesso grande único no lobo direito em $\geq 80\%$ dos pacientes crônicos. Complicações como ruptura do abscesso, superinfecção e anemia são comuns aos pacientes agudos ou crônicos, porém anemia severa é quase sempre mais comum nos crônicos. Pacientes em fase aguda geralmente apresentam sintomatologia mais agressiva, porém a resposta terapêutica (uso de amebicida com ou sem drenagem cirúrgica) são semelhantes nos dois casos (KATZENSTEIN et al., 1982).

1.3 Amebíase hepática e Resposta Imune

Embora, nenhum modelo animal reproduza *in vivo* o ciclo de *E. histolytica* completo como no homem, a infecção experimental por *E. histolytica* em hamsters e gerbils apresenta uma amebíase hepática semelhante ao homem, no entanto, os trofozoítos em gerbils são aparentemente menos virulentos do que em hamsters. Ratos e diferentes espécies de camundongos são animais resistentes à amebíase, porém têm sido úteis em estudos imunológicos, onde se demonstrou a participação de neutrófilos, óxido nítrico e citocinas pró inflamatórias no processo de rejeição na infecção amebiana (TSUTSUMI; SHIBAYAMA, 2006).

É de conhecimento que, não existe ainda modelo animal no qual a administração de cistos por via oral, reproduza amebíase intestinal e hepática espontaneamente. Estudos experimentais *in vivo*, relatam que para se provocar a doença tanto intestinal como hepática, os trofozoítos devem ser injetados direta e separadamente no órgão alvo (TSUTSUMI; SHIBAYAMA, 2006).

Ainda não se conhecem os mecanismos, mas observações clínicas e laboratoriais com animais sugerem que eles possuem uma resistência para se infectarem naturalmente com *E. histolytica*. No homem ocorre o contrário, porque ele é naturalmente infectado ao ingerir os cistos deste parasita. Estudos das bases celulares e moleculares da imunidade em espécies resistentes como os ratos podem ajudar a elucidar a susceptibilidade e resistência por *E. histolytica* (JARILLO-LUNA, 2002).

Em amebíase, pouco se sabe a respeito da proteção imunológica, mas aparentemente tanto a resposta inata quanto a adquirida limitam a infecção amebiana (ASGHARPOUR et al.,

2005; HAQUE et al., 2002; HOUPY et al., 2002; HUSTON; PETRI et al., 1998; IVORY et al., 2007; SEYDEL et al., 2000). Embora, os mecanismos da imunidade inata não sejam bem conhecidos na amebíase, pesquisas mostram que é essencial para eliminar o parasita (SHIBAYAMA et al., 2008).

A fase primária da infecção por *E. histolytica* no fígado em modelos experimentais como hamsters, tem como característica a presença de uma intensa reação inflamatória com presença de trofozoitos de *E. histolytica* acompanhados por inúmeros polimorfonucleares e alguns eosinófilos (BRANDT; PÉREZ-TAMAYO, 1970; TSUTSUMI et al., 1984; TSUTSUMI; MARTÍNEZ-PALOMO, 1988).

Sabe-se que a resposta imune mediada por células na amebíase, desempenha um papel fundamental tanto no início da doença como também para conter a sua recorrência (TRISSEL, 1982). Através de estudos *in vitro*, observou-se que neutrófilos humanos têm uma atividade amebicida estimulada por IFN- γ e TNF- α ficando os macrófagos com um papel protetor na amebíase por sua ação destruidora de *E. histolytica* (DENIS; CHADEE, 1989; GHADIRIAN; BOUT, 1988; SALATA, 1987).

Em camundongos, macrófagos peritoneais e derivados da medula óssea, são estimulados por IFN- γ e TNF- α tendo uma significativa atividade amebicida (DENIS; CHADEE, 1989).

Em macrófagos isolados de gerbil, modelo animal suscetível à amebíase hepática, ocorre o contrário, produzem baixo nível de TNF- α e não respondem aos estímulos de IFN- γ e lipopolissacáride (LPS) que geralmente produz altos níveis de TNF- α . Em macrófagos “naive” houve uma diminuição de TNF- α quando expostos à proteínas amebianas *in vitro* (WANG et al., 1992).

O óxido nítrico (NO) é um gás que apresenta uma meia-vida de 5-10 segundos e está envolvido em várias condições fisiológicas e patológicas (BADAL; BROWN; RAGOOBIRSHINGH, 2006). O NO endógeno produzido pela óxido nítrico sintase (NOS) atua na homeostase vascular, na neurotransmissão e em mecanismos de defesa do hospedeiro (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A principal via metabólica do NO é a oxidação gradual para nitrito e nitrato (YOSHIDA et al., 1983). As enzimas óxido nítrico sintases (NOS) catalisam a síntese de NO a partir da conversão do aminoácido L-arginina mais oxigênio para produzir NO e L-citrulina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; MARLETTA, 1994). Em mamíferos, o NO é sintetizado por três isoformas diferentes da enzima óxido nítrico sintase (NOS). As isoenzimas são óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e a endotelial (eNOS) (FORSTERMANN; SESSA, 2012). As

enzimas eNOS e nNOS são de expressão constitutiva e a iNOS é induzível (ALDERTON; COOPER; KNOWLES; 2001; MARLETTA, 1994).

A fase crônica da amebíase hepática é mediada por imunidade celular deficiente, principalmente pela inabilidade de macrófagos derivados de abscessos hepáticos expressarem iNOS e de produzirem NO. Em modelos animais, macrófagos de granulomas hepáticos são refratários à ativação por IFN- γ e LPS, não produzem citocinas inflamatórias e não matam trofozoítos. Esta supressão é local e causada pelo parasita, e as populações de macrófagos distantes das lesões hepáticas permanecem imunologicamente funcionantes (DENIS; CHADEE, 1988; WANG et al., 1994).

Os mecanismos que explicam este processo anérgico ainda são desconhecidos e em modelos murinos o processo inicial das respostas imune e inflamatória não são favorecidos pela presença de TNF- α . Em macrófagos ativados ocorre a transcrição do gene do TNF- α , mas não há expressão proteica da molécula. Os estudos das respostas imune e inflamatórias no homem são escassas e por vezes contraditórias (ORTIZ-ORTIZ et al., 1975; PETRI et al., 2000).

O NO é uma das moléculas que tem um papel no desenvolvimento da AHA, e isto foi demonstrado por estudo *in vitro*, no qual ele diminuiu a proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* sugerindo um papel protetor na amebíase (KOLB; KOLB-BACHOFEN, 1992; LIN et al., 1994). Em outro estudo *in vitro*, detectou-se a morte de trofozoítos de *E. histolytica* mediada por NO produzido por macrófagos ativados (J.-Y.; SEGUIN; KELLER; CHADEE, 1994).

A produção de NO bem como a expressão de iNOS se encontram aumentados em hamsters experimentalmente infectados com *E. histolytica* e que desenvolveram AHA (PACHECO-YEPEZ et al., 1997; RAMÍREZ-EMILIANO et al., 2005). Ao contrário dos camundongos, em hamsters e no homem, o abscesso hepático é devido a um excesso de produção de NO (PACHECO-YÉPEZ et al., 2001; RAMIREZ-EMILIANO et al., 2007).

A *E. histolytica* inibe a atividade amebicida dos macrófagos mediada por NO através do consumo de L-arginina (ELNEKAVE; SIMAN-TOV; ANKRI, 2003). A resistência do camundongo provavelmente é devida à respostas imunes não específicas entre elas a ativação de neutrófilos e a produção de NO, importantes fatores amebicidas (JARILLO-LUNA; CAMPOS-RODRÍGUEZ; TSUTSUMI, 2002). Além da atividade amebicida do NO, o TNF- α e o TGF- β também participam desta citotoxicidade contra *E. histolytica* (LIN et al., 1995).

Tanto em experimentos *in vitro* como em modelos animais com amebíase hepática, observou-se que o IFN- γ é importante no controle precoce da invasão por *E. histolytica*. Sabe-

se que *in vitro*, o desenvolvimento da função amebicida dos neutrófilos e monócitos são dependentes de IFN- γ (DENIS; CHADEE, 1989; GHADIRIAN; SALIMI, 1993; SALATA et al., 1987). Utilizando-se camundongos CB-17 SCID, que possuem deficiência na produção de IFN- γ , observou-se que, houve um aumento significativo de AHA, após inocular o fígado com amebas, comparado com AHA induzido no camundongo tipo selvagem. Os autores concluíram com base nestes dados, que o IFN- γ através do aumento da atividade amebicida dos neutrófilos e macrófagos, previne a formação de AHA (SEYDEL et al., 2000).

A *E. histolytica* pode direcionar a resposta imune para o tipo Th-2 conveniente para uma invasão bem sucedida em indivíduos suscetíveis (MURRAY, 1998).

Uma resposta imune do tipo Th1 parece ser responsável pela contenção da progressão na amebíase invasiva (KRETSCHMER, LÓPEZ-OSUNA, 1990). Dessa forma, indivíduos portadores de sintomas para amebíase intestinal ou invasiva apresentam concentrações mais elevadas de IL-4, IL-10 e TGF- β quando comparados com controles. Indivíduos assintomáticos portadores de *Entamoeba sp.*, não apresentam diferenças significativas nas concentrações dessas citocinas quando comparadas ao grupo controle. De uma forma geral, as interleucinas IL-4, IL-10 e TGF- β , apresentam a capacidade de suprimir a resposta imune celular, resultando em uma infecção sintomática (BANSAL et al, 2005). Com a progressão das lesões no fígado, a população celular que circunda as lesões se altera sendo a presença de macrófagos fato marcante durante o desenvolvimento dos granulomas, que por sua vez são indicativos de uma resposta polarizada Th2. A formação destes parece ser induzida por macrófagos ativados por citocinas como IL-4 e IL-13 (GORDON, 2003; WILSON et al., 2007).

As células natural killer (NK), linfócitos efetores da imunidade inata, se infiltram nos abscessos hepáticos amebianos e passam a ser fonte de IFN- γ no início do desenvolvimento do abscesso. Assim, camundongos deficientes de células NK, desenvolvem abscessos maiores do que os respectivos controles (LOTTER et al., 2006).

Em fase aguda de amebíase hepática em gerbil, foram encontrados altos níveis de IL-2 e de IL-4 e baixos níveis de TNF- α em sobrenadantes de suspensões celulares de linfonodos, até o quinto dia após a inoculação de *E. histolytica* (CAMPBELL; CHADEE, 1997).

A resposta imune adaptativa, caracterizada por sua especificidade e memória é mediada por linfócitos B e T e a resposta imune inata em mamíferos, primeira linha de defesa é mediada por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células endoteliais (HALLMAN et al., 2001; JANSSENS; BEYAERT, 2003; MICHELSEN et al., 2004).

Além dos macrófagos, ocorre também uma supressão das células T. Em pacientes recuperados com amebíase hepática houve uma desproporção de células TCD4+ e TCD8+ e uma proliferação anormal quando estimulados com o mitógeno de células T, concanavalina A (Con A). A contagem total de células T foi normal, havendo um grande aumento de TCD8+ e uma diminuição de TCD4+. Um ano após a infecção, muitos pacientes voltam a apresentar uma proporção normal de TCD8+ : TCD4+ e o grau desta proporção se correlaciona com a proliferação com concanavalina A (Con A) (SALATA; MARTINEZ-PALOMO; MURRAY, 1986).

Em animais também ocorre uma imunossupressão, onde insuficientes níveis de IL-2, principal fator de proliferação de linfócitos T, é uma explicação provável para a supressão de células T “naive” com Con A quando se utilizam soros de animais infectados (CAMPBELL; GAUCHER; CHADEE, 1999). Em soros de pacientes humanos recuperados recentemente da doença, também houve uma supressão da proliferação de linfócitos T com antígenos de *E. histolytica*. Na presença de soros não imunes, os linfócitos de pacientes com amebíase hepática, proliferam muito e produzem IFN- γ , enquanto que com soros imunes a proliferação é muito diminuída com pouca ou nenhuma produção de IFN- γ (SALATA et al., 1990).

1.4 Amebíase Hepática–Tratamento

Existem dois tipos de medicamentos para tratar amebíase que são os anti-amebianos de tecidos como o 5-nitroimidazol e, os luminais como o furoato de diloxanida e a paramomicina. Doença invasiva deve ser tratada com anti-amebiano de tecido seguido por amebicida luminal (WHO, 1997).

O metronidazol é o anti parasitário mais utilizado no tratamento da amebíase, tanto para a intestinal quanto para a hepática, variando na dose que é maior para o AHA. Da família do 5-nitroimidazol é ineficaz contra infecções do lúmen intestinal, apresenta efeitos colaterais e seu uso generalizado e desnecessário pode desenvolver resistência à droga (IRUSEN; JACKSON; SIMJEE, 1992). A utilização de novas moléculas para o controle da resposta imune na amebíase é importante, porque existem poucos medicamentos para o tratamento da doença.

1.5 Melatonina

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um derivado do aminoácido essencial triptofano, e é um composto sintetizado principalmente pela glândula pineal. Foi isolada em 1958 por Lerner à partir da glândula pineal de bovinos (LERNER et al., 1958).

À princípio, quando foi isolada, acreditava-se que a melatonina era um hormônio exclusivo da glândula pineal. Com a utilização de anticorpos altamente específicos e métodos de detecção, a melatonina foi detectada em vários locais extrapineais não endócrinos, como o sistema imune (CARRILLO-VICO et al., 2004; KVETNOY, 2002; KVETNOY, 1999). É sintetizada também na retina (FAILLACE et al., 1995), trato gastrointestinal (BUBENIK, 2002; HUETHER et al., 1992), pele (SLOMINSKI et al., 2002) e leucócitos (CARRILLO-VICO et al., 2004) presentes tanto no sangue periférico (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1993) como na medula óssea (CONTI et al., 2000; TAN et al., 1999), ambos sintetizam melatonina.

A melatonina é encontrada não só em órgãos distintos como também em vários organismos e sua versatilidade funcional se reflete em sua ampla distribuição dentro de organismos distantes filogeneticamente, de bactérias aos seres humanos. Tem sido identificada em todo o reino animal e vegetal, em organismos unicelulares e invertebrados (HARDELAND; POEGGELER, 2003; SRINIVASAN et al., 2010). A principal função da melatonina é mediar sinais escuros com possíveis implicações no controle da ritmicidade circadiana e sazonalidade (YONEYAMA; HASHIMOTO; HONMA, 1999).

A secreção da melatonina na glândula pineal de mamíferos é proporcional à duração da noite, funcionando como um sinal biológico da escuridão. Esta informação temporal serve para sinalizar aos outros sistemas sobre a época do ano e hora do dia. As propriedades cronobióticas são uma função fisiológica importante desta indolamina, com relevância clínica em fases e períodos de mudança como o “jet lag” e trabalho por turnos (ARENDT; SKENE, 2005; RAJARATNAM; ARENDT, 2001).

A liberação circadiana noturna da melatonina tem uma profunda influência em processos fisiológicos do organismo. Primordialmente sincroniza o organismo com o fotoperíodo influenciando diferentes funções fisiológicas como reprodução, metabolismo, sazonalidade, termorregulação, propriedades imunomodulatórias e envelhecimento e em patofisiologias como câncer, desordens do sono, epilepsia, desordens afetivas sazonais e doenças oculares (FEYCHTING et al., 1998; YU et al., 1993;).

A melatonina é um poderoso antioxidante (TAN et al., 1993) e foi demonstrado que age sequestrando diferentes tipos de radicais livres *in vitro* (POEGGELER et al., 1996), em fluidos corporais (DU PLESSIS et al., 2010) e em células (ZAVODNIK et al., 2006).

Por consequência, ocorre uma diminuição de espécies reativas de oxigênio melhorando patologias relacionadas como hipertensão (REITER et al., 2009), aterosclerose (BRONCEL et al., 2007), câncer (RAVINDRA et al., 2006), isquemia (REITER et al., 2005), doenças neurodegenerativas (SKAPER et al., 1999). Além disso, a melatonina previne envelhecimento (REITER et al., 1998).

Em espécies diurnas e noturnas, a ausência de luz à noite estimula a biosíntese da melatonina. Sinais elétricos originados na retina, alcançam o núcleo supraquiasmático, o qual envia sinais via núcleo paraventricular para a medula espinhal e então para o gânglio cervical superior do sistema nervoso simpático. As fibras terminam ao nível dos pinealócitos. Uma maior liberação de noradrenalina, provocada pela ausência de luz, estimula receptores $\alpha 1$ e β adrenérgicos dos pinealócitos que desencadeiam uma série de respostas intracelulares, ativando enzimas que levam à síntese da melatonina (YU et al., 1993).

Com a captação ativa do seu precursor o aminoácido triptofano da circulação para a glândula pineal, ocorre a síntese da melatonina através de quatro etapas enzimáticas intracelulares sucessivas que começam com o triptofano passando por 5-hidroxitriptofano, serotonina, N-acetilserotonina, até a formação da melatonina (KLEIN, 1999).

À noite a melatonina é secretada e atinge um valor de pico de 80-150 pg/ml entre meia noite e três horas da manhã, enquanto a sua concentração durante o dia é baixa (10-20 pg/ml) (DZIEGIEL, PODHORSKA-OKOLOW; ZABEL, 2008). Uma vez formada, a melatonina não é estocada na glândula pineal, mas difunde para o líquido cefalorraquidiano ou diretamente para o sangue (TRICOIRE et al., 2003). Na circulação, é metabolizada no fígado e excretada pela urina na forma de seu principal metabólito que é o sulfato 6-OH-melatonina (CLAUSTRAT et al., 2005; HIRATA et al., 1974). É uma indolamina, com capacidade para entrar em qualquer compartimento celular ou fluido corporal, por possuir dois grupamentos em sua estrutura o que a torna uma molécula anfifílica facilitando também a sua ligação com receptores. Por ser altamente lipossolúvel, ela passa facilmente da circulação periférica para células e outros fluidos corporais (HARDELAND et al., 2006).

A melatonina produzida por órgãos não endócrinos, não é regulada por ciclos circadianos, mas respondem a outros sinais exercendo um efeito parácrino ou autócrino (CARRILLO-VICO et al., 2004). A mais alta produção de melatonina no organismo ocorre na medula óssea (concentrações em micromolar) e excede em pelo menos duas vezes mais os

níveis no plasma, de maneira que concentrações locais de melatonina podem ser diferentes daqueles regulados por suas funções neuro endócrinas (CARRILLO-VICO et al., 2005).

A concentração de melatonina no plasma varia de acordo com o ciclo circadiano e seus efeitos no organismo, são periódicos (REITER, 1999). A melatonina se liga a receptores específicos e alvos intracelulares exercendo efeitos regulatórios nas células (CARLSON, 1989; PANDI-PERUMAL, 2008).

As células expressam receptores MT1/MT2 em sua membrana plasmática que desencadeiam sinalização intracelular pela adenilato ciclase ou proteína G dependendo do ambiente intracelular. Devido à pequena estrutura lipofílica da melatonina, ela atravessa facilmente as membranas biológicas, e a maioria de suas ações são mediadas por receptores de membrana e nucleares, como a superfamília de receptores hormonais nucleares RZR/ROR. Alguns autores relatam que receptores nucleares da melatonina estão relacionados aos efeitos imunomodulatórios (CARRILLO-VICO et al., 2003; REPPERT et al., 1994).

1.6 Melatonina-Sistema Imune

A melatonina, principal hormônio secretado pela glândula pineal tem um importante papel neuroimunomodulatório. Os linfócitos expressam receptores para vários hormônios, inclusive para a melatonina (BLALOCK, 1994).

Quantidades relativas de melatonina são sintetizadas biologicamente no homem, por células sanguíneas mononucleares periféricas (CARRILLO-VICO et al., 2004), atuando no sistema imune regulando a produção de citocinas por células imunocompetentes. Aumenta a produção de IL-2, IFN- γ e IL-6 por células mononucleares humanas cultivadas (GARCIA-MAURINO et al., 1997).

Através dos receptores de membrana e nucleares de melatonina acredita-se que a melatonina influencie células do sistema imune. Ambos são encontrados em leucócitos e os receptores de membrana são encontrados principalmente em linfócitos TCD4+, mas também em TCD8+ e células B (GARCIA-MAURINO; GONZALES-HABA; CALVO, 1997; MAESTRONI, 2001; POZO et al., 1997). A melatonina modula a resposta proliferativa de linfócitos estimulados. Induz a produção de citocinas por células mononucleares sanguíneas humanas via receptores nucleares de melatonina (GARCIA-MAURINO et al., 1998).

Apesar de ainda não bem esclarecido, acredita-se que a melatonina atue na fagocitose e na apresentação de antígenos, melhorando a resposta imune. Macrófagos de baço aumentam a apresentação de antígenos para células T, após tratamento com melatonina, levando à uma

maior expressão de MHC classe II e a um aumento da citocinas pró inflamatórias IL-1 e TNF- β (PIOLI et al., 1993).

A melatonina induz a um aumento de IL-12 que leva as células T a uma diferenciação para fenótipo Th1 (MAESTRONI; CONTI; PIERPAOLI, 1986). A IL-12 induz células T e NK a produzirem IFN- γ para aumentar a atividade citotóxica das células NK, para agir como mitógeno ou comitógeno para células T e NK e para aumentar a geração de linfócitos T citotóxicos (TRINCHIERI, 1997). A melatonina aumenta a atividade das células NK em humanos, e aumenta a produção de células NK e monócitos na medula óssea de camundongos (ANGELI; GATTI; SARTORI, 1987; CURRIER; MILLER, 2000).

A melatonina possui também propriedades antioxidantes que aliada a sua capacidade de atravessar membranas celulares, age como um receptor independente de radicais livres e com um grande espectro antioxidante (TAN et al., 2007). É um potente sequestrante de radicais livres eliminando diretamente radical hidroxila que é altamente tóxico além de outros radicais contendo oxigênio centralizado. Possui efeito antioxidante também pelo aumento dos níveis das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase. Inibe a enzima pró oxidante, óxido nítrico sintase (MANEV et al., 1996).

Com a pinealectomia em ratos ou inibição da luz em seres humanos, observou-se que houve uma inibição do ritmo diário exibido pelo sistema de defesa antioxidante. Nos seres humanos existem pouco dados sobre os efeitos protetores da melatonina contra os radicais livres (HERRERA et al., 2001).

Enquanto a melatonina tem um efeito regulatório positivo sobre a resposta imune, alguns trabalhos científicos apontam que esta molécula tem uma ação anti-inflamatória que age inibindo a resposta imune em alguns casos. Acredita-se ser em parte, devido à uma indução de resposta Th2 com a produção da citocina IL-4, que acaba inibindo as células Th1 (SHAJI et al., 1998).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar um possível efeito imunomodulatório da melatonina sobre a infecção hepática de ratos *Wistar*, infectados com a cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* através dos seguintes parâmetros:

- ❖ análise por citofluorimetria de fluxo das populações de células TCD3+, TCD4+, TCD8+, CD45+ e CD161+.
- ❖ dosagem das citocinas: IFN- γ (Th1) e IL-4 (Th2)
- ❖ dosagem de Óxido Nítrico

Desta forma, o estudo dos possíveis efeitos da administração de Melatonina durante a fase aguda da formação do abscesso hepático amebiano em ratos *Wistar*, foi realizada em um curto espaço de tempo utilizando metodologias de fácil execução que certamente oferecerão dados importantes que servirão de base para futuros trabalhos envolvendo doenças parasitárias e modulação do eixo Hipotálamo - Hipófise - Adrenal.

3 JUSTIFICATIVA

O objetivo deste trabalho foi de avaliar uma possível ação imunomodulatória da melatonina, devido à existência de poucos medicamentos disponíveis com um mínimo de efeitos colaterais, podendo este hormônio colaborar no tratamento da amebíase.

A proposta deste trabalho é inédita, visto não se encontrar disponível outros trabalhos que relatem a ação da melatonina durante a infecção hepática por *E. histolytica* em ratos *Wistar*. Como aproximadamente 1% dos casos clínicos de amebíase envolvem o fígado (HAQUE et al., 2003), é importante o estudo da amebíase hepática em modelos experimentais murinos resistentes à esta doença. Dessa forma, os experimentos nos permitiram conhecer um pouco mais da resposta imune na relação parasita-hospedeiro durante a amebíase hepática. O uso de modelos animais resistentes é muito importante na infecção por *E. histolytica*, para obtermos informações sobre tipos celulares e possíveis mecanismos envolvidos na resposta imune contra este parasita. Ratos, camundongos e cobaias têm sido muito usados em estudos de resistência amebiana à infecção intestinal ou hepática, e ainda moléculas como citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico encontram-se envolvidos na rejeição amebiana (TSUTSUMI; SHIBAYAMA, 2006).

Como já é de conhecimento a melatonina possui um significativo efeito imunomodulatório. Nosso grupo de pesquisa já fez uso deste hormônio como agente imunomodulador na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* onde foi demonstrada uma redução significativa da parasitemia durante a fase aguda da infecção, além de um aumento nos níveis de IL-2 e IL-12 em animais suplementados com melatonina (SANTELLO et al., 2007; SANTELLO et al., 2009).

Enfatizamos que a utilização da Melatonina não pode ser considerada como uma substância destinada à cura da doença, mas sim uma substância com ação imunoestimuladora, conforme inúmeros trabalhos anteriormente publicados (GUERRERO; REITER, 2002; MAESTRONI, 2001). A intenção desta pesquisa foi utilizar este hormônio como agente imunomodulador colaborando no tratamento da amebíase hepática junto com os medicamentos já existentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos jovens com idade compreendida entre 45 a 50 dias, pesando 140-150g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto. Esses animais foram mantidos em caixa plástica com maravalha a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, em número de 5 animais por caixa com ração específica para roedores e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto (Protocolo número 11.1.90.53.3).

4.2 Cultura de *Entamoeba histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS, foram mantidos em cultura axênica em meio de cultivo BI-S-33 (DIAMOND et al., 1978), suplementado com 15% de soro bovino adulto inativado, 3% de Vitaminas Diamond (Biofluids), 100U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina em tubos de borosilicato à 37°C em condições anaeróbicas (CERVANTES-REBOLLEDO et al., 2009). Os repiques das cepas foram realizados três vezes por semana, e os parasitas utilizados em fase exponencial de crescimento para a inoculação dos ratos *Wistar*. As culturas de trofozoítos foram colocadas em gelo por 10 minutos. Os trofozoítos foram então centrifugados a 500g por 7 minutos e os sedimentos foram agrupados e levados à câmara de Neubauer para contagem do número de parasitas. Os inóculos foram ressuspensos em meio BI-S-33 e acertados para 2×10^6 em 150µl de meio BI-S-33. Os parasitos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Amebíase da UFMG do Prof. Dr Edward Félix da Silva e mantidos no Laboratório de Parasitologia Profª Dra. Rosa Domingues Ribeiro da FCFRP-USP.

4.3 Infecção

Decorridos os dias de ambientalização, os animais dos grupos infectados foram inoculados no fígado com 2×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* da cepa HM1-IMSS como descrito à seguir:

4.3.1 Inoculação de Fígado de Ratos com Cultura de *E.histolytica*

Após anestesia com associação de 1ml de xilazina 20mg/ml + 1ml de cloridrato de cetamina 10% (100mg/ml) utilizando 0,1 a 0,15ml da associação/100gramas (peso do animal) por via intramuscular, o animal foi fixado em mesa limpa dentro do fluxo laminar, sendo feita a assepsia do abdômen com álcool iodado e em seguida com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas estéreis e bisturi, foi feita a laparotomia com incisão mediana longitudinal, de aproximadamente 1,0 a 1,5cm de comprimento, abaixo do apêndice xifóide. Depois de seccionado o peritônio, o fígado foi facilmente exposto e com uma seringa de 1ml graduada ao centésimo, com uma agulha 10 x 5 foi inoculado no parênquima hepático a suspensão de amebas em meio BI-S-33. O volume inoculado foi de 150µl contendo 2×10^6 amebas e em seguida o peritônio e a pele do animal foram suturados com fio de nylon estéril. Os animais foram acondicionados em gaiolas e mantidos sob observação até a eutanásia.

4.4 Grupos de Animais

Foram utilizados 5 grupos contendo 5 animais para cada grupo, totalizando 25 animais.

GRUPO INFECTADOS:

I - infectados no fígado com trofozoítos de *E.histolytica* ; administração oral de PEG 400 / Água Milli-Q*;

I MEL - infectados no fígado com trofozoítos de *E.histolytica*; tratados com melatonina;

GRUPOS NÃO INFECTADOS:

CONTROLE - sem qualquer manipulação no fígado ou seja sem inocular trofozoítos de *E.histolytica* e sem meio BI-S-33; não tratado com melatonina e sem administração oral de PEG 400/ Água Milli-Q;

SHAM - não infectados no fígado com trofozoítos apenas meio BI-S-33**; não tratados com MEL e com administração oral de PEG 400/Água Milli-Q;

NI MEL - não infectados no fígado com trofozoítos de *E.histolytica* apenas com meio BI-S-33; tratados com melatonina;

* PEG 400 / Água Milli-Q é o veículo diluente da melatonina.

** Meio BI-S-33: meio de cultura dos trofozoítos de *E.histolytica*.

4.5 Eutanásia e Coleta de Sangue

A eutanásia foi feita por decapitação com utilização prévia de Tribromoetanol (2,5%) dose de 0,01 ml/grama. Após a morte dos animais, foram coletados 5 ml de sangue em tubos plásticos sem anticoagulante para obtenção de soro.

4.6 Dias de Experimento

Os experimentos foram realizados no 6º dia após o inóculo infectante. Cada experimento foi repetido em triplicata.

4.7 Suplementação de Melatonina

A melatonina (Sigma, Chemical Co) foi administrada na dose de 5mg / kg diluída em PEG 400 / Água MILLI-Q (1:1) via oral por gavagem aos ratos *Wistar* machos em todos os dias desde a inoculação do parasita *E. histolytica*, no fígado dos animais até o sexto dia após. Aos grupos controle foi administrada via oral o veículo PEG 400 / Água Milli-Q. A dose foi baseada em estudos com outro parasita *Trypanosoma cruzi* e melatonina onde se observou um efeito imunomodulatório deste neurohormônio (SANTELLO et al., 2007).

4.8 Quantificação de Nitrito

Foram injetados 10ml de meio RPMI 1640 completo a 4°C na cavidade peritoneal dos ratos e após leve massagem foi retirado o líquido peritoneal. Estas células foram centrifugadas por 15 minutos à 1500 rpm, o sobrenadante desprezado. O pellet foi ressuspensão em 1ml de RPMI 1640 completo contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. As células foram diluídas em solução de Turk, contadas em câmara de Neubauer e as concentrações foram acertadas para 5×10^6 células/ml. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, com o volume 100 µl/poço contendo 5×10^6 cel/ml e nos poços controle foram adicionados 100 µl/poço de LPS (10µg/ml) e incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ por 48 horas à 37°C. Após este período, a placa foi centrifugada à 1500 rpm por 4 minutos à 23°C e 100 µl do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços.

A quantidade de nitrito acumulada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais foi dosada por espectrofotometria utilizando-se reagente de Griess, e a revelação

da reação por meio de leitor de microplacas utilizando filtro de 540nm. A curva padrão de 200 μm até 6 μm foi realizada utilizando nitrito de sódio com diluição seriada na base 2 (HRUBY et al., 1997; TERENCE et al., 1995).

4.9 Análise Fenotípica das Populações Celulares por Citofluorimetria de Fluxo

Para a realização desta análise por citometria, foram utilizadas células do baço que foram maceradas em 5ml de meio RPMI 1640 (GibcoBR) em peneiras com porosidade. Em seguida, as células foram centrifugadas 1000 rpm por 15 minutos a 10°C, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 10ml de RPMI completo (com soro bovino fetal inativado). Os tubos foram cuidadosamente homogeneizados e pipetado 20 μl desta solução em 980 μl de solução de Turk para contagem das células em câmara de Neubauer.

A contagem de linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+, CD45+ e CD161+ foi realizada por citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais, marcados com substâncias fluorescentes dirigidos contra antígenos de superfície destas células. Foram utilizados nos experimentos anticorpos monoclonais conjugados com PE (r-phicoeritrin), FITC (Fluorescein isotiocianate), PERCP (Peridin Clorofil Protein), APC (aloficocianina).

As marcações das células do baço foram ressuspensas a uma concentração de 1×10^7 células /ml em tampão fosfato (PBS) contendo 1% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% de azida sódica (Tampão de FACS). Em seguida alíquotas de 200 μl , foram pipetadas em placas de 96 poços fundo em U e centrifugadas à 2000 rpm por 4 minutos a 10°C, sendo o sobrenadante descartado.

O “pellet” foi suavemente agitado e as células incubadas com 30 μl Fc-Block (soro de camundongo (evita ligações inespecíficas)) em tampão de FACS por 30 minutos a 4°C.

Após foi adicionado 170 μl de tampão de FACS às células que foram centrifugadas a 2000 rpm por 4 minutos a 10°C, e o sobrenadante descartado.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais relevantes conjugados com anti CD3+ FITC, anti CD4+APC, anti CD8+ PerCP, anti CD45+PE e anti CD161+PE (diluídos em tampão de FACS (1:30), incubadas por 30 minutos a 4°C protegidas da luz. Após foram lavadas três vezes com 200 μl de tampão de FACS e centrifugadas a 2000 rpm durante 4 minutos. As células foram ressuspensas em 0,5ml de tampão de FACS. A aquisição e análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo [FACSscan Becton Dickinson,

Sunnyvale, CA] e 20.000 células foram analisadas. Foi utilizado o software DIVA- BD para análise dos resultados.

4.10 Dosagens de Citocinas:

4.10.1 Dosagens de IFN- γ e IL-4

As concentrações de citocinas nos soros dos animais foram quantificadas, à partir do 6º dia após a inoculação dos fígados dos ratos *Wistar* com *E. histolytica* através da técnica de imunoensaio enzimático quantitativo (ELISA) utilizando Kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). As placas de poliestireno de 96 poços, já vieram sensibilizadas com anticorpos de captura anti citocinas para ratos. e as curvas foram preparadas com quantidades conhecidas das citocinas de acordo com o fabricante. Os limites de detecção para a citocina IL-4 foi de 15,6 pg/ml e para o IFN- γ foi de 31,2 pg/ml. As amostras foram preparadas em duplicatas e as leituras foram feitas em leitor de microplacas(Teccan, Modelo Sunrise) à um comprimento de onda 450 nm.

4.11 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados deste trabalho foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 5.0. Para a significância estatística ($P < 0,05$) entre os grupos foi utilizada a análise de variância One-way ANOVA e post test de Bonferroni.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Fenotípica das Populações Celulares por Citofluorimetria de Fluxo

5.1.1 População Celular TCD3+

Figura 2. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos TCD3+ no baço de ratos *Wistar* machos infectados ou não com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, no 6º dia após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental n=5.

$P < 0,05$

CONTROLE vs NI MEL, I MEL

SHAM vs NI MEL, I MEL

NI MEL vs I

I vs I MEL

A administração da melatonina aos grupos tratados infectados (I MEL) e não infectados (NI MEL), levou à uma produção de linfócitos TCD3+ bem mais elevada em relação à todos os grupos, sendo estatisticamente significante em relação aos grupos não tratados e não infectados CONTROLE e SHAM. Nos grupos infectados e tratados com melatonina (I MEL) e não infectado tratado com melatonina (NI MEL) houve também um aumento estatisticamente significante no número de linfócitos TCD3+ em relação ao grupo infectado não tratado com melatonina (I).

5.1.2 População Celular TCD4+

Figura 3. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos TCD4+ no baço de ratos *Wistar* machos infectados ou não com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, no 6º dia após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental n=5.

$P < 0,05$

CONTROLE vs NI MEL, I MEL

SHAM vs NI MEL, I MEL

NI MEL vs I

I vs I MEL

A administração de melatonina aos grupos infectados (I MEL) e não infectados (NI MEL) levou à uma elevação significativa estatisticamente de linfócitos TCD4+ em relação aos grupos não infectados e não tratados com melatonina CONTROLE e SHAM e também com relação ao grupo infectado não tratado (I).

Os animais infectados e tratados com melatonina apresentaram valores de linfócitos TCD4+ significativamente maiores quando comparados aos animais infectados e não tratados.

5.1.3 População Celular TCD8+

Figura 4. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos TCD8+ no baço de ratos *Wistar* machos infectados ou não com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, no 6º dia após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental n=5.

$P < 0,05$

CONTROLE vs NI MEL, IMEL

SHAM vs NI MEL, I MEL

NI MEL vs I

I vs I MEL

Nos grupos não infectados observou-se um aumento significativo da porcentagem de células TCD8+ para os animais não infectados e suplementados com melatonina quando comparados aos animais não infectados e não suplementados com melatonina ($p < 0,05$).

Nos grupos infectados observou-se um aumento estatisticamente significativo da porcentagem de células TCD8+ para os animais infectados e suplementados com melatonina quando comparados aos animais infectados e não suplementados com melatonina ($p < 0,05$).

5.1.4 População Celular CD45+

Figura 5. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos CD45+ no baço de ratos *Wistar* machos infectados ou não com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, no 6º dia após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental n=5.

$P < 0,05$

CONTROLE vs NI MEL, I MEL

SHAM vs NI MEL, I MEL, I

NI MEL vs I

I vs I MEL

Nos grupos não infectados observou-se um aumento significativo da porcentagem de células CD45+ para os animais não infectados e suplementados com melatonina quando comparados aos animais não infectados e não suplementados com melatonina ($p < 0,05$).

Nos grupos infectados observou-se um aumento estatisticamente significativo da porcentagem de células CD45+ para os animais infectados e suplementados com melatonina quando comparados aos animais infectados e não suplementados com melatonina.

5.1.5 População Celular CD161+

Figura 6. Efeito da melatonina sobre a produção de linfócitos CD161+ no baço de ratos *Wistar* machos infectados ou não com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, no 6º dia após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental n=5.

$P < 0,05$

CONTROLE vs I MEL

SHAM vs NI MEL, I MEL

I vs I MEL

Nos grupos não infectados observou-se um aumento significativo da porcentagem de células CD161+ para os animais não infectados e suplementados com melatonina quando comparados aos animais não infectados e não suplementados com melatonina.

Nos grupos infectados observou-se um aumento estatisticamente significativo da porcentagem de células CD161+ para os animais infectados e suplementados com melatonina quando comparados aos animais infectados e não suplementados com melatonina.

5.2 Dosagem de Citocinas

5.2.1 IL-4

Figura 7. Concentração de IL-4 em pg/ml em soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com 2×10^6 trofozoítos de *E.histolytica* coletados 6 dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental $n=5$.

A produção de IL-4 foi baixa não apresentando valores estatisticamente significantes entre os grupos analisados.

5.2.2 IFN- γ

Figura 8. Concentração de IFN- γ em pg/ml em soro de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados com 2×10^6 trofozoítos de *E.histolytica* coletados 6 dias após a infecção nos seguintes grupos: Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental n=5.

A suplementação de melatonina no tocante à produção de IFN- γ não ocasionou alterações significativas nas concentrações dessa interleucina. Observa-se uma tendência de elevação para o grupo não infectado suplementado com melatonina quando comparado ao não infectado e não suplementado como também nos animais infectados suplementados com melatonina em relação aos animais infectados e não suplementados.

5.3 Dosagem de nitrito

A Sem LPS

B Com LPS

Figura 9. Concentração de NO (μM) a partir de macrófagos peritoneais não estimulados **(A)** ou estimulados **(B)** com LPS ($10\mu\text{g/ml}$). Macrófagos foram coletados de ratos *Wistar* machos no sexto dia após a inoculação do fígado destes animais com $2,0 \times 10^6$ trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, dos seguintes grupos : Grupo Controle; Grupo Sham; Grupo não infectado tratado com melatonina; Grupo infectado; Grupo infectado tratado com melatonina. Para cada grupo experimental $n=5$.

Sem LPS 6º dia :

$P < 0,05$ CONTROLE vs NI MEL, I

$P < 0,05$ SHAM vs I

$P < 0,05$ NI MEL vs I

$P < 0,05$ I vs I MEL

Com LPS 6º dia :

$P < 0,05$ CONTROLE vs NI MEL

$P < 0,05$ SHAM vs NI MEL

$P < 0,05$ NI MEL vs I

$P < 0,05$ I vs I MEL

A – Sem LPS - A administração de melatonina diminuiu a produção de óxido nítrico nos grupos infectado e não infectado tratados com melatonina. O óxido nítrico atingiu picos mais altos no grupo infectado, sendo estatisticamente significante a diferença entre este grupo e o grupo infectado tratado com melatonina. O grupo não infectado tratado com melatonina apresentou os menores níveis de óxido nítrico, sendo significante em relação ao grupo controle não infectado.

B – com LPS - Houve um aumento na produção de óxido nítrico em todos os grupos estimulados com LPS em relação aos grupos não estimulados com LPS. O grupo não infectado e tratado com melatonina revelou concentrações mais baixas quando comparadas aos animais não infectados e não suplementados ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu no grupo infectado e suplementado com melatonina quando comparado aos animais infectados e não suplementados com melatonina ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A amebíase é uma doença parasitária que debilita muitas pessoas em várias partes do mundo, e a incidência deste protozoário continua aumentando, sem que se tenha desenvolvido uma vacina para esta doença.

Em regiões endêmicas com condições sanitárias precárias, a morbidade e a mortalidade da amebíase são altas, e a busca de novas substâncias visando um mínimo de efeitos colaterais ao paciente é muito importante, principalmente quando se trata da amebíase hepática que é potencialmente fatal.

Como é de conhecimento, a incidência da amebíase hepática no homem é de menos de 1%, o que nos leva a caracterizá-lo como resistente à esta doença. Dessa forma, escolhemos como modelo experimental ratos da linhagem *Wistar* que são resistentes à amebíase hepática. Este trabalho avaliou a ação imunológica protetora da melatonina durante a amebíase hepática experimental, através da infecção no fígado com trofozoítos da cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*.

A melatonina é uma molécula pleiotrópica que pode agir em diferentes etapas do processo inflamatório. Na fase aguda a melatonina exerce um papel pró-inflamatório ativando mediadores como fosfolipase (PLA2), lipoxigenase (LOX) e citocinas. Quando o processo inflamatório evolui para a fase crônica, apresenta um efeito contrário, modulando negativamente os mediadores PLA2, LOX e citocinas, induzindo nos leucócitos uma via de sobrevivência e atuando como antioxidante. As funções pró e anti-inflamatórias da melatonina promovem, regulam e podem neutralizar a inflamação simultaneamente (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010).

De um modo geral, os nossos resultados demonstraram uma ação pró-inflamatória da melatonina, no sentido de melhorar a resposta imune do hospedeiro, através de um aumento no total de células T (TCD3+, TCD4+, TCD8+) (Figuras 2, 3 e 4). Nossos dados indiretamente corroboram os de SANTELLO et al., (2009) onde esses autores trabalhando na fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi* também observaram um aumento dessas populações celulares nos animais orquiectomizados infectados e tratados com melatonina.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula com importante papel no desenvolvimento da amebíase hepática, e isto foi demonstrado por estudo *in vitro*, onde a proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* diminuiu, sugerindo um papel protetor na amebíase (KOLB; KOLB-BACHOFEN, 1992; LIN et al., 1994). Em outro estudo *in vitro*, detectou-se a morte

de trofozoítos de *E.histolytica* mediada por NO produzido por macrófagos ativados (J.-Y.; SEGUIN; KELLER; CHADEE, 1994).

Deve-se ressaltar que a alta produção de NO pode ser prejudicial às células do hospedeiro agravando o quadro clínico e patológico através de um mecanismo onde o NO pode alterar as pontes dissulfeto e os grupos heme das proteínas assim como as bases de DNA (LOWENSTEIN; DINERMAN; SNYDER, 1994).

Nossos dados revelaram que tanto os macrófagos peritoneais de ratos *Wistar* estimulados ou não com LPS e tratados com melatonina, apresentaram uma redução significativa nos níveis de nitrito em relação aos grupos controles não tratados com melatonina (Figuras 9B e 9A). De certa forma podemos relatar uma ação anti-inflamatória da melatonina no sentido de atenuar a produção excessiva de nitrito a fim de evitar danos mais sérios ao hospedeiro. Esses dados podem ser fundamentados ao analisarmos o trabalho de Mauriz et al., 2012. Neste estudo, os autores sugerem que o papel anti-inflamatório da melatonina seja exercido através da regulação de diferentes vias moleculares tais como modulação de fatores de transcrição como, por exemplo, o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (MAURIZ et al., 2012). O NF- κ B é um fator de transcrição pleiotrópico que regula genes que expressam várias enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2), e citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas podem se deslocar para diferentes tecidos ocasionando nestes, modificações estruturais e funcionais (KARIN; YAMAMOTO; WANG, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001; ROSALES-CORRAL, et al., 2010). A melatonina através de seu efeito anti-inflamatório inibe a ligação de NF- κ B ao DNA provavelmente para evitar a sua translocação para o núcleo (CHUANG et al., 1996). Assim, a melatonina diminui a expressão das isoformas da óxido nítrico sintase induzível e da ciclooxigenase limitando a produção de excessivas quantidades de óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos bem como outros mediadores da inflamação tais como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (MAURIZ et al., 2012). Nossos resultados sugerem correlação direta com os relatados por Mauriz et al, 2012, onde os animais infectados e não infectados tratados com melatonina apresentaram uma redução estatisticamente significativa nas concentrações de óxido nítrico (Figuras 9A e 9B).

Quanto a estimulação com LPS, nossos dados indiretamente confirmam os apresentados por FORSTERMANN et al., (1994) e (2000) onde os autores relatam que a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) não é normalmente expressa nas células, mas induzida por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), citocinas e outros agentes. Embora, tenha sido primariamente detectada em macrófagos pode ser expressa em qualquer célula ou tecido

desde que por agentes indutores adequados. Os nossos dados mostraram uma elevação na produção de óxido nítrico nos macrófagos peritoneais de ratos *Wistar* estimulados por LPS (Figura 9 B) em relação aos grupos não estimulados por LPS (Figura 9 A), corroborando diretamente com os autores (RAMÍREZ-EMILIANO; GONZÁLEZ-HERNANDE; ARIAS-NEGRETE, 2005) que observaram que macrófagos peritoneais de hamsters em cultivo expressaram RNAm para óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e sintetizaram NO quando estimulados por LPS.

Na literatura alguns trabalhos mostram uma supressão da resposta imune celular durante a infecção por protozoários como *Leishmania donovani* (BARRAL et al., 1991) e *Trypanosoma cruzi* (HAREL et al., 1983). Na amebíase, estudos mostraram também que durante a fase aguda da infecção por *E. histolytica* a resposta de células T é sistematicamente suprimida em modelos animais (CAMPBELL; CHADEE, 1997) e em pacientes com amebíase hepática (SALATA; MARTINEZ-PALOMO; MURRAY, 1986).

Em animais infectados ocorre uma imunossupressão, com insuficiente produção de células T “naive”. A explicação mais provável para este fenômeno é uma produção insuficiente de IL-2, principal fator de proliferação de linfócitos T (CAMPBELL et al., 1999).

De acordo com SALATA et al., (1990) no homem foi relatada a supressão de células T para antígenos de *E. histolytica*, no soro de pacientes recuperados recentemente de amebíase hepática. Os linfócitos de pacientes com AHA proliferam muito em contato com soro não imune e produzem IFN- γ . O mesmo não acontece na presença de soro imune onde a proliferação de linfócitos T é muito prejudicada e o IFN- γ é pouco ou nada produzido. Segundo CAMPBELL (1999) a retirada de anticorpos amebianos do soro imune, não reverte o efeito justificando que o soro imune contém fatores que reprimem as respostas de células T.

Embora, o mecanismo pelo qual a melatonina modula positivamente a resposta imune não seja conhecido, parece ser devido a um aumento da fagocitose e apresentação de antígenos, mediando a regulação da expressão de citocinas em órgãos como baço, timo, linfonodo e medula óssea (SRINIVASAN et al., 2005). Em relação aos nossos dados, as concentrações de IFN- γ (Figura 8) apresentaram tendência a uma elevação, porém sem significância estatística. A suplementação com melatonina elevou essas concentrações quando comparamos os animais infectados e tratados aos animais não tratados com melatonina, estando parcialmente de acordo com SALATA et al., (1990) onde relatam uma imunossupressão de células T em fase aguda que possivelmente pode ter contribuído para uma baixa produção desta interleucina no soro. O trabalho de WU-GUO-DENG et al., (2006) indiretamente confirma nossos resultados. Os autores mostraram que o LPS e IFN- γ

aumentaram o poder de ligação das distintas isoformas de NF- κ B aos promotores de COX-2 e iNOS. De maneira oposta, a melatonina inibia a ligação das isoformas de NF- κ B a esses promotores, consequentemente diminuindo o grau de inflamação, de modo a proteger o organismo de uma produção exacerbada desta interleucina.

No tocante aos níveis de IL-4 nossos dados não apresentaram alterações significativas (figura 7). No nosso entendimento esse resultado corrobora diretamente com (SRINIVASAN et al., 2005) onde a adição de melatonina possivelmente aumentou diferentes populações celulares imprescindíveis para uma resposta Th-1, característica no intuito de conter a invasão e multiplicação do parasita no tecido hepático. Dessa maneira as concentrações reduzidas de IL-4 sugerem que a melatonina pode ter uma tendência aparentemente a induzir durante a fase aguda da amebíase experimental um padrão de resposta do tipo Th-1.

O trabalho de RAI; HALDAR (2003) mostrou que a administração exógena de melatonina através de injeções diárias provocou um aumento no peso de órgãos como o baço e o timo em roedores. De acordo com (SZE; LIU; NG, 1993; DEMAS; NELSON, 1998) a melatonina leva também à um aumento na capacidade proliferativa de células do baço de camundongos e segundo (LIEBMANN et al, 1996; MARTINS et al., 1998) aumenta a proliferação de linfócitos de ratos. Nossos resultados confirmam diretamente os autores (LIEBMANN et al, 1996; MARTINS et al., 1998)) pois a melatonina possivelmente atuou elevando a percentagem no número total de linfócitos T nas populações celulares TCD3+, TCD4+ e TCD8+ dos baços dos animais suplementados com melatonina nos grupos infectados e não infectados com significância estatística em relação aos animais não tratados com melatonina.

Na amebíase invasiva a produção de anticorpos é o principal efeito imunológico no homem, embora não seja sinônimo de resistência à infecção ou proteção imunológica (KRUPP; POWELL, 1971). Em casos de amebíase extraintestinal os anticorpos apresentam um ação mais efetiva quando comparados com a forma intestinal da doença (KRUPP; POWELL, 1971; SALATA; RAVDIN, 1986). Os nossos dados confirmam indiretamente os autores (KRUPP; POWELL, 1971) pois houve uma elevação importante na produção das células CD45+ nos animais tratados com melatonina quando comparados aos animais não tratados (Figura 5), o que indiretamente implica em uma maior produção de anticorpos. A elevação significativa da porcentagem de células B (Figura 5) com a administração oral de melatonina corrobora indiretamente com os dados de (Yu; Miller; Osmond, 2000) que demonstraram que a melatonina administrada por via oral pode promover sobrevivência substancial de precursores de linfócitos B (anti-apoptose), responsável pela imunidade

humoral, na medula óssea. Isto indica que o tratamento com melatonina pode aumentar a sobrevivência de células B maduras que são os elementos funcionais da imunidade humoral.

Em mamíferos, a melatonina exógena atua em respostas imunes não específicas. Estimula o aumento de células natural killer (NK) e de monócitos na medula óssea e no baço de camundongos (CURRIER; SUN; MILLER, 2000), enquanto que no homem, LISSONI et al. (1986) descreveu um aumento da atividade das células natural killer (NK) induzido pela melatonina.

As células natural killer (NK) são detectadas no início da amebíase hepática em camundongos e desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro produzindo IFN- γ e peptídeos citolíticos após a ativação (LOTTER et al., 2006; TSUTSUMI et al., 1984). Um aumento da citotoxicidade das células NK foi detectada em camundongos infectados com ameba patogênica comparado com os animais infectados com cepas não patogênicas, sugerindo uma defesa das células NK neste modelo animal (KIM, K.H.; SHIN, C.O.; IM, K., 1993). Os nossos resultados estão de acordo com o trabalho de (CURRIER; SUN; MILLER, 2000) que relataram um aumento de células natural killer (NK) e de monócitos na medula óssea e no baço de camundongos após a administração exógena da melatonina, confirmando os nossos resultados onde os animais tratados com melatonina tiveram uma elevação estatisticamente significativa de células CD161+ em relação aos animais não tratados e suplementados com melatonina (figura 6).

Dessa forma podemos afirmar que a administração exógena de melatonina provocou a adequação de respostas imunes efetivas na tentativa de diminuir a replicação parasitária bem como as ações patogênicas desta parasitose.

7 CONCLUSÕES

De maneira geral a administração oral de melatonina a ratos *Wistar* infectados com *E. histolytica* exerceu suas ações de molécula pleiotrópica sobre todos os parâmetros analisados, ora atuando como uma substância pró-inflamatória aumentando a resistência do hospedeiro à infecção que pode ser traduzido pelo aumento de diversas sub-populações celulares. Atuou também como uma substância anti-inflamatória diminuindo a produção de NO por macrófagos peritoneais no sentido de conter uma exacerbação da resposta inflamatória tão danosa ao hospedeiro na amebíase hepática experimental.

8 REFERÊNCIAS

ACKERS, J.P.; MIRELMAN, D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 367–373, 2006.

ADAMS, E.B.; MACLEOD, I.N. Invasive amebiasis I. Amebic dysentery and its complications. **Medicine**, v. 56, p. 315–323, 1977.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, p. 593-615, 2001.

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

ARENDT, J; SKENE, D. J. Melatonin as a chronobiotic. **Sleep Med. Rev**, v. 9, p. 25–39, 2005.

ARIAS-NEGRETE, S.; CHADEE, K. Immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. In: PARADISSE, L. J.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. (Ed.). **Enteric infections and immunity**. New York: Plenum Press, 1996. p. 207-226.

ASGHARPOUR, A.; GILCHRIST, C; BABA, D.; HAMANO, S.; HOUP, E. Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. **Infect. Immun**, v. 73, p. 4522-4529, 2005.

BADAL, S.; BROWN, P.D.; RAGOOBIRSINGH, D. Nitric oxide agents impair insulin-mediated signal transduction in rat skeletal muscle. **BMC Biochem**, v. 7, p. 17, 2006.

BANSAL, D.; SEHGAL, R.; CHARLA, Y.; MALLA, N.; MAJAN, C. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 37–43, 2005.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SANTOS, S.B.; CARVALHO, E.M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; REED, S.G.; JOHNSON, W.D.Jr. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v. 147, p. 281–284, 1991.

BENETTON, M.L.; GONÇALVES, A.V.; MENEGHINI, M.E.; SILVA, E.F.; CARNEIRO, M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 99, n. 7, p. 532-40, 2005.

BERNINGHAUSEN, O.; LEIPPE, M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun**, v. 65, p. 3615–3621, 1997.

BLALOCK, J.E. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 74, p. 292–8, 1994.

BRAGA, L.L.; GOMES, M.L.; SILVA M.W.; PAIVA C.; SALES A.; MANN, B.J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeast Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 5, p. 467–71, 2001.

BRANDT, H.; PÉREZ-TAMAYO, R. Pathology of human amebiasis. **Hum Pathol**, v.1, p. 351–385, 1970.

BRONCEL, M.; KOZIRÓG-KOLACINSKA, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA J. Melatonin in the treatment of atherosclerosis. **Pol Merkur Lekarski**, v. 23, p. 124–7, 2007.

BRUMPT, E. Bull. Acad. Méd. (Paris), v. 94, p. 943–952, 1925.

BUBENIK, G.A. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. **Dig Dis Sci**, v. 47, p. 2336–48, 2002.

Bulletin of the World Health Organization. WHO meeting on strategies for control of amoebiasis, Geneva, v. 63, n. 3, p. 417–426, 1985.

CABALLERO-SALCEDO, A; VIVEROS-ROGEL, M; SALVATIERRA, B.; TAPIA-CONYER, R.; SEPULVEDA-AMOR, J.; GUTIERREZ, G.; ORTIZ-ORTIZ, A. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 4 p. 412–419, 1994.

CAMPBELL, D.; CHADEE, K. Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. **J Infect Dis**, v.175, n. 5., p. 1176–1183, 1997.

CAMPBELL, D.; GAUCHER, D.; CHADEE, K. Serum from *Entamoeba histolytica* infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting Interleukin-2 production. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 1495–1501, 1999.

CAMPBELL, D.; GAUCHER, D.; CHADEE, K. Serum from *Entamoeba histolytica* infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting Interleukin-2 production. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1495–1501, 1999.

CAMPBELL, D.; K. CHADEE. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune responses. **Trends Parasitol**, v. 13, p. 184-190, 1997.

CARLSON, L.L.; WEAVER, D.R.; REPPERT, S.M. Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. **Endocrinology**, v. 125, p. 2670-6, 1989.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J.R.; ABREU, P.; LARDONE, P.J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J**, v. 18, n. 3, p. 537-9, 2004.

CARRILLO-VICO, A.; GARCIA-PERGANEDA, A.; NAJI, L.; CALVO, J.R.; ROMERO M.P.; GUERRERO, J.M. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, p. 2272-2278, 2003.

CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J.M.; LARDONE, P.J.; REITER, R.J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**, v. 27, p. 189-200, 2005.

CERVANTES-REBOLLEDO, C.; MORENO-MENDOZA, N.; MORALES-MONTOR, J.; DE LA TORRE, P.; LACLETTE, J.P.; CARRERO, J.C. Gonadectomy inhibits development of experimental amoebic liver abscess in hamsters through downregulation of the inflammatory immune response. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 8, p. 447-56, 2009.

CHADEE, K., MEEROVITCH, E. The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Am J Pathol**, v. 117, p. 71-80, 1984.

CHADEE, K.; PETRI, W.A. JR.; INNES, D.J.; RAVDIN, J.I. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **J Clin Invest**, v. 80, p. 1245-1254, 1987.

CHUANG, J.I.; MOHAN, N.; MELTZ, M.L.; REITER, R.J. Effect of melatonin on NF-Kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. **Cell Biol Int**, v. 20, p. 687-92, 1996.

CLARK, C. G.; DIAMOND, L. S. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. **Exp Parasitol**, v. 77, p. 450-455, 1993.

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

CONTI, A.; CONCONI, S.; HERTENS, E.; SKWARLO-SONTA, K.; MARKOWSKA, M.; MAESTRONI, G.J.M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **J Pineal Res**, v. 28, p. 193–202, 2000.

CUNHA, A. S.; SILVA, E. F.; RASO, P.; MELLO, S. M. Patogenia da amebíase. I- aspectos clínicos da amebíase no Brasil. Estudo realizado em três grupos populacionais de três regiões geográficas distintas. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 19, n. 5, p. 289-300, 1977.

CURRIER, N.L.; SUN, L.Z.; MILLER, S.C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. **J Neuroimmunol**, v. 104, n. 2, p. 101-108, 2000.

DEMAS, G.E.; NELSON, R.J. **J. Biol. Rhythms**, v. 13, p. 245–252, 1998.

DENIS, M.; CHADEE K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Infect Immun**, v. 57, p. 1750–1756, 1989.

DENIS, M.; CHADEE K. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. **J Leukoc Biol**, v. 46, p. 270–274, 1989.

DENIS, M.; CHADEE, K. In vitro and in vivo studies of macrophage functions in amebiasis. **Infect Immun**, v. 56, p. 3126-3131, 1988.

DIAMOND, L.S.; HARLOW, D.R.; CUNNICK, C.C.: A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.72, p. 431-432, 1978.

DU PLESSIS, S.S.; HAGENAAR, K; LAMPIAO, F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, v. 42, p. 112–6, 2010.

DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; ZABEL, M. Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. **Med Sci Monit**, v. 14, p. 64–70, 2008.

ELNEKAVE, K.; SIMAN-TOV, R.; ANKRI, S. Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. **Parasite Immunol**, v. 25, n. 11-12, p. 597-608, 2003.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, p. 318–331, 2000.

FAILLACE, M.P.; CUTRERA, R.; KELLER-SARMENTO, M.I.; ROSENSTEIN, R.E. Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. **Neuroreport**, v. 6, p. 2093–5, 1995.

FEYCHTING, M.; OSTERLUND, B.; AHLBOM, A. Reduced cancer incidence among the blind. **Epidemiology**, v. 9, p. 490-494, 1998.

FORSTERMANN, U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In: MAYER, B. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**: nitric oxide. Berlin: Springer, 2000. p. 71-91.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, p. 829–837, 2012.

FORSTERMANN, U; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, p. 1121–1131. 1994.

GARCIA-MAURINO, S.; GONZALES-HABA, M.G.; CALVO, J.R. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN-g production by human circulating CD4+ cells. **J Immunol**, v. 159, p 574-581, 1997.

GARCIA-MAURINO, S.; GONZALEZ-HABA, M.G.; CALVO, J.R.; GOBERNA, R; 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**, v.92, n. 1-2, p. 76-84, 1998.

GARCÍA-ZEPEDA, E.A.; ROJAS-LÓPEZ, A.; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-SALOMA P. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. **Parasite Immunol.**, v. 29, n.12, p. 679-84, 2007.

GHADIRIAN, E.; BOUT, D.T. In vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites by interferon-gamma-activated mouse macrophages. **Immunobiology**, v. 176, n, 4-5, p. 341-53, 1988.

GHADIRIAN, E.; SALIMI, A. In vitro effect of recombinant interferon gamma in combination with LPS on amoebicidal activity of murine kupffer cells. **Immunobiology**, v.188, p. 203–219, 1993.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v.3, p. 23–35, 2003.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. **Endocr. Res.**, v. 18, p. 91-113, 1992

GUERRERO, J.M., REITER, R.J. Melatonin-immune system relationships. **Curr Top Med Chem**, v. 2, n. 2, p. 167-79, 2002.

HALLMAN, M.; RAMET, M.; EZEKOWITZ, R.A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. **Pediatr Res**, v. 50, p. 315-21, 2001.

HAQUE, R.; DUGGAL, P.; ALI, I.M.; HOSSAIN, M.B.; MONDAL, D.; SACK, R.B.; FARR, B.M.; BEATY T.H.; PETRI W.A.Jr. Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladeshi children. **J Infect Dis**, v. 186, p. 547-552, 2002.

HAQUE, R.; HUSTON, C. D.; HUGHES, M.; HOUPPT, E.; PETRI, W.A.Jr. Amebiasis. **The N Engl J Med**, v. 348, p. 1565-1573, 2003.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S.R.; CARDINALI, D.P. Melatonin. **Int J Biochem Cell Biol**, v.38, p.313–6, 2006.

HARDELAND, R.; POEGGELER, B. **J. Pineal Res.**, v. 34, p. 233–241, 2003.

HAREL, B.A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D.; EISEN, H. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected *Trypanosoma cruzi*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.80, p. 3466–3469, 1983.

HERRERA, J.; NAVA, M.; ROMERO, F.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. **Am J Kidney Dis**, v. 37, p. 750–757, 2001.

HIRATA, F.; HAYAISHI, O.; TOKUYAMA, T.; SENNO, S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. **J Biol Chem**, v. 249, p. 1311–1313, 1974.

HOUPPT, E.R.; GLEMBOCKI, D.J.; OBRIG, T.G.; MOSKALUK, C.A.; LOCKHART, L.A.; WRIGHT, R.L.; SEANER, R.M.; KEEPERS, T.R.; WILKINS, T.D.; PETRI, W.A.Jr. The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. **J. Immunol.** v. 169, p. 4496-4503, 2002.

HRUBY, Z.; BECK, K.F. Cytotoxic effect of autocrine and macrophage-derived nitric oxide on cultured rat mesangial cells. **Clin Exp Immunol.** v. 107; n. 1, p. 76-82, 1997.

- HUETHER, G.; POEGGELER, B.; REIMER, A.; GEORGE, A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in checks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. **Life Sci**, v. 52, p. 945–53, 1992.
- HUGHES, M.A.; PETRI, W.A.Jr. Amebic liver abscess, **Infect Dis Clin North Am**, v. 14, p. 565–582, 2000.
- HUSTON, C.D.; PETRI, W.A.Jr. Host–pathogen interaction in amebiasis and progress in vaccine development. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 17, p. 601–614, 1998.
- IRUSEN, E.M.; JACKSON, T.F.H.G.; SIMJEE, A.E. Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic *E. histolytica* in amoebic liver abscess: prevalence response to therapy, and pathogenic potential. **Clin Infect Dis**, v. 14, p. 889–893, 1992.
- IVORY, C.; KAMMANADIMINTI, S.; CHADEE, K. Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. **Trends Parasitol**, v. 23, p. 46–48, 2007.
- J.-Y., LIN; SEGUIN, R.; KELLER, K.; CHADEE, K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. **Infect Immun**, v. 62, p. 1534–1541, 1994.
- JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, p. 637–46, 2003.
- JARILLO-LUNA, R. A.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; TSUTSUMI, V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. **Exp Parasitol**, v. 101, n. 1, p. 40–56, 2002.
- KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, Q.M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p. 17–26, 2004.
- KATZENSTEIN, D.; RICKERSON, V.; BRAUDE, A., New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego, **Medicine**, v. 61, p. 237–246, 1982.
- KELM, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, p. 273–289, 1999.
- KIM, K.H.; SHIN, C.O.; IM, K. Natural killer cell activity in mice infected with free-living amoeba with reference to their pathogenicity. **Korean J Parasitol**, v. 31, p. 239–248, 1993.

KLEIN, D.C. Serotonin N-acetyltransferase. A personal historical perspective. **Adv Exp Med Biol**, v. 460, p. 5–16, 1999.

KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol Today**, v. 13, p. 157-160, 1992.

KOTLOFF, K.L.; WINICKOFF, J.P.; IVANOFF, B.; CLEMENS, J.D.; SWERDLOW, D.L.; SANSONETTI, P.J.; ADAK, G.K.; LEVINE, M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull World Health Organ**, v. 77, p. 651-666, 1999.

KRETSCHMER, R. R.; LÓPEZ-OSUNA, M. Effector mechanisms and immunity to amebas. In: KRETSCHMER, R. (Ed.). **Amebiasis: infection and disease by E. Histolytica**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 105-122.

KRUPP, I.M.; POWELL, S.J. Antibody response to invasive ame-biasis in Durban, South Africa. **Am J Trop Med Hyg**, v. 20, p. 414–420, 1971.

KVETNOY, I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. **Neuro Endocrinol Lett.**, v. 23, n. 1, p. 92–96, 2002.

KVETNOY, I. M. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem. J.* v. 31, p. 1–12, 1999.

LEIPPE, M. Amoebapores. **Parasitol Today**, v.13, p. 178–183, 1997.

LEIPPE, M.; EBEL, S.; SCHOENBERGER, O.L.; HORSTMANN, R.D.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.88, n. 17, p. 7659-63, 1991.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin the pineal gland factor that lightens melanocytes. **J Am Chem Soc**, v. 80, p. 2587–2589, 1958.

LIDELL, M.E.; MONCADA, D.M.; CHADEE, K.; HANSSON, G.C. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 9298–9303, 2006.

LIEBMANN, P.M.; HOFER, D.; FELSNER, P.; WÖFLER, A.; SCHAUENSTEIN, K. Beta-blockade enhances adrenergic immunosuppression in rats via inhibition of melatonin release. **J Neuroimmunol**, v. 67, n. 2, p. 137-42, 1996.

LIN, J.Y.; SEGUIN, R.; KELLER, K.; CHADEE, K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1534-41, 1994.

LIN, J.Y.; SEGUIN, R.; KELLER, K.; CHADEE, K. Transforming growth factor beta 1 primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for nitric oxide-dependent cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*. **Immunology**, v. 85, n. 3, p. 400-7, 1995.

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

LOPEZ-GONZALEZ, M.A.; CALVO, J.R.; SEGURA, J.J.; GUERRERO, J.M. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. **Biotechnol Ther**, v.4, p. 253-62, 1993.

LOTTER, H.; JACOBS, T.; GAWORSKI, I.; TANNICH, E. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. **Infect Immun**, v. 74, p. 118-124, 2006.

LOWENSTEIN, C.J.; DINERMAN, J.L.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann Intern Med**, v. 1, n. 120(3), p. 227-37, 1994.

MAESTRONI, G.J.M. The immunotherapeutic potential of melatonin. **Exp Opin Invest Drugs**, v.10, p. 467-476, 2001.

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

MANESCHY, L. A. P. **Abscesso Amebiano na Amazônia**. 1974. Tese (Livre Docência) – Centro Biomédico, Universidade Federal do Pará, Belém, 1974.

MANEV, H.; UZ, T.; KHARLAMOV, A.; CAGNOLI, C.M.; FRANCESCHINI, D.; GIUSTI, P. In vivo protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone melatonin: effect of exogenous melatonin and circadian rhythm. **Restor Neurol Neurosci**, v. 9, p. 251-256, 1996.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-30, 1994.

MARTÍNEZ-PALOMO, A.; ESPINOSA CANTELLANO, M. Intestinal amoebae, In COX, F. E. G.; Kreier, J.P.; Wakelin, D. (ed.), Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. Edward Arnold, New York, N.Y, p. 157–177, 1998.

MARTINS, E.JR.; FERNANDES, L.C.; BARTOL, I.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L.F. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. **J Neuroimmunol**, v. 82, p. 81–89, 1998.

MAURIZ, J.L.; COLLADO, P.S.; VENEROSO, C.; REITER, R.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **J Pineal Res**, 2012.

MEZA, I. Extracellular matrix induced-signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. **Parasitol Today**, v. 16, n. 1, p. 23-28, 2000.

MICHELSSEN, K.S.; DOHERTY, T.M.; SHAH, P.K.; ARDITI, M. TLR signaling: An emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. **J Immunol**, v. 173, p. 5901-7, 2004.

MONCADA, D.; KELLER, K.; CHADEE, K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. **Infect Immun**, v. 71, p. 838–844, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MURRAY, J.S. How the MCM selects Th1/Th2 immunity. **Immunol Today**, v. 19, p. 157–163, 1998.

OLIVEIRA -COSTA, J.; RESENDE, J.A.; GOMES, M.A. Prevalência de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais de um laboratório privado na grande Belo Horizonte. Semana de iniciação científica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2006.

OLIVOS-GARCÍA ,A.; NEQUIZ-AVENDAÑO, M.; TELLO, E.; MARTÍNEZ, R.D.; GONZÁLEZ-CANTO, A.; LÓPEZ-VANCELL, R.; GARCÍA de LEÓN, M.C.; MONTFORT, I.; PÉREZ-TAMAYO, R. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. **Exp Mol Pathol**, v. 77, p. 66–71, 2004.

ORTIZ-ORTIZ, L.; ZAMACONA G.; SEPÚLVEDA, B.; CAPÍN, N.R. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 4, p. 127-34, 1975.

PACHECO-YÉPEZ, J.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; SHIBAYAMA, M.; VENTURA-JUÁREZ, J.; SERRANO-LUNA, J.; TSUTSUMI, V. *Entamoeba histolytica*: production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. **Parasitol Res.**, v. 87, n. 1, p. 49-56, 2001.

PACHECO-YEPEZ, J.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; VENTURA-JUÁREZ, J.; SHIBAYAMA, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; TSUTSUMI, V. Role of nitric oxide in experimental hepatic amebiasis. **Arch Med Res.**, v. 28, p. 214-6, 1997.

PACHECO-YÉPEZ, J.; GALVÁN-MOROYOQUI, J.M.; MEZA, I.; TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M. Expression of cytokines and their regulation during amoebic liver abscess development. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 56-64, 2011.

PANDI-PERUMAL, S.R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W.; MAESTRONI, G.J.; ZISAPEL, N., et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Prog Neurobiol**, v. 85, p. 335-53, 2008.

PETERSON, K. M.; SHU, J.; DUGGAL, P.; HAQUE, R.; MONDAL, D.; PETRI, W.A.Jr. Association between TNF- α and *Entamoeba histolytica* diarrhea. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, n. 4, p. 620-625, 2010.

PETRI, W.A. Jr. Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: From lab bench to bedside. **J Invest Med**, v. 44, p. 24-35, 1996.

PETRI, W.A. JR; MANN, B.J.; HAQUE, R. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 39-64, 2002.

PETRI, W.A. Recent advances in amebiasis. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 33, p. 1-37, 1996.

PETRI, W.A.Jr.; HAQUE, R.; LYERLY, D.; VINES, R.R. Estimating the impact of amebiasis on health. **Parasitol Today**, v. 16, n. 8, p. 320-321, 2000.

PIOLI, C.; CAROLEO, M. C.; NISTICO, G.; DORIA, G. **Int J Immunopharmacol**, v. 15, p. 463-468, 1993.

POEGGELER, B.; REITER, R.J.; HARDELAND, R.; TAN, D.X.; BARLOW-WALDEN, L.R. Melatonin and structurally related endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. **Redox Rep**, v. 2, p. 179-84, 1996.

POZO, D.; DELGADO, M.; FERNANDEZ-SANTOS, J.M.; CALVO, J.R.; GOMARIZ, R.P.; MARTIN-LACAVE, I.; ORTIZ, G.G.; GUERRERO, J.M. Expression of melatonin receptor

mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. **FASEB J**, v. 11, p. 466-473, 1997.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 80, p. 1844–1852, 2010.

RAI, S.; HALDAR, C. Pineal control of immune status and hematological changes in blood and bone marrow of male squirrels (*Funambulus pennanti*) during their reproductively active phase. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 136, p. 319–328, 2003.

RAJARATNAM, S. M.; ARENDT, J. **Lancet**, v. 358, p. 999–1005, 2001.

RAMIREZ-EMILIANO, J.; FLORES-VILLAVICENCIO, L.L.; SEGOVIA, J.; ARIAS-NEGRETE, S. Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development. **Medicina (B Aires)**. v. 67, n. 2, p.167-76, 2007.

RAMÍREZ-EMILIANO, J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A.; ARIAS-NEGRETE, S. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and nitric oxide production during the development of liver abscess in hamster inoculated with *Entamoeba histolytica*. **Curr Microbiol**. v. 50, n. 6, p. 299-308, 2005.

RAVINDRA, T.; LAKSHMI, N.K.; AHUJA, Y.R. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. **Indian J Med Sci**, v. 60, p. 523–35, 2006.

REEVES, R.E. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. **Adv Parasitology**, v. 23, p. 105-142, 1984.

REITER, R.J.; GUERRERO, J.M.; GARCIA, J.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p. 410–24, 1998.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; KORKMAZ, A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. **J Hypertens Suppl**, v. 27, p. 17–20, 2009.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; LEON, J.; KILIC, U.; KILIC, E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. **Exp Biol Med**, v. 230, p. 104–17, 2005.

REPPERT, S.; WEAVER, D.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, v. 13, p. 1177–85, 1994.

REY, L. *Entamoeba histolytica* e Amebíase II: A doença. In: Parasitologia Médica. 2 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 1991.

ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R.J.; TAND, X.; ORTIZ, G.G.; LOPEZ-ARMAS, G. Functional aspects of redox control during neuro-inflammation. **Antioxid Redox Signal**; v. 13, p. 193–247, 2010.

SALATA R.A.; MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; RAVDIN, J.I. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Am J Trop Med Hyg**, v. 37, p. 72–78, 1987.

SALATA, R.A.; MARTINEZ-PALOMO, A.; CANALES, L.; MURRAY, H.W.; TREVINO, N.; RAVDIN, J.I. Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. **Infect Immun**, v.58, p. 3941–3946, 1990.

SALATA, R.A.; MARTINEZ-PALOMO, A.; MURRAY, H.W. Patients treated for amoebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. **J Immunol**; v. 136, p. 2633–2639, 1986.

SALATA, R.A.; RAVDIN, J.I. Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. **Rev Infect Dis**, v. 8, p. 261–272, 1986.

SANTELLO, F.H.; DEL VECCHIO FILIPIN M.; CAETANO, L.C.; BRAZÃO, V.; CAETANO, L.N.; SANTOS, C.D.; ALONSO TOLDO, M.P.; do PRADO J.C.Jr. Influence of melatonin therapy and orchietomy on T cell subsets in male *Wistar* rats infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Pineal Res**, v. 47, p. 271–276, 2009.

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

SANTOS, F. L. **Implantação e avaliação do diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

SEPÚLVEDA, B.; TREVINO-GARCÍA, N.; MANZO, N. Clinical manifestations and diagnosis of amebiasis. In: MARTÍNEZ-PALOMO, A. (Ed.). Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1986. p. 169-188.

SEYDEL, K.B.; SMITH, S.J.; STANLEY, S.L.Jr. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on γ interferon and nitric oxide in a murine model of disease. **Infect Immun**, v. 68, p. 400-402, 2000.

SHAJI, A.V.; KULKARNI, S.K.; AGREWALA, J.N. Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. **Clin Exp Immunol**, v. 111, p. 181-185, 1998.

SHIBAYAMA, M.; RIVERA-AGUILAR, V.; BARBOSA-CABRERA, E.; ROJAS-HERNÁNDEZ, S.; JARILLO-LUNA, A.; TSUTSUMI, V.; PACHECO-YEPEZ, J.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. Innate immunity prevents tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. **Can J Microbiol**, v. 54, n. 12, p. 1032-1042, 2008.

SILVA, E.F.; GOMES M.A. Amebíase: *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba díspar*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11^a edição. SÃO PAULO: Editora Ateneu, 2005. Capítulo 15, p. 127-138.

SKAPER, S.D.; FLOREANI, M.; CECCON, M; FACCI, L.; GIUSTI, P. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. **Ann N Y Acad Sci**, v. 890, p. 107-18, 1999.

SLOMINSKI, A.; PISARCHIK, A.; SEMAK, I.; SWEATMAN, T.; WORTSMAN, J.; SZCZESNIEWSKI A.; SLUGOCKI, G.; MCNULTY, J.; KAUSER, S.; TOBIN, D.J.; JING, C.; JOHANSSON, O., et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. **FASEB J**, v. 16, p. 896-8, 2002.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W.; MOSCOVITCH, A.; PANDI-PERUMAL, S.R.; TRAKHT, I.; BROWN, G.M.; CARDINALI, D.P. Malaria: therapeutic implications of melatonin. **J Pineal Res**, v. 48, p. 1-8, 2010.

SRINIVASAN,V.; MAESTRONI, G.J.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I.; PANDI-PERUMAL, S.R.; MILLER, S.C. Melatonin, immune function and aging. **Immun Ageing**, v. 2, p. 17-27, 2005.

SZE, S.F; LIU, W.K.; NG, T.B. Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. **J Neural Transm Gen Sect**, v. 94.p. 115-126, 1993.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; QI, W.B.; ZHANG, M.; WEINTRAUB, S.T.; CABRERA, J.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1472, p. 206-14, 1999.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J.; REITER, R.J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J Pineal Res**, v. 42, p. 28-42, 2007.

TAN, D-X; CHEN, L.D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr J**, v. 1, p. 57–60, 1993.

TENGKU, S.A.; NORHAYATI, M. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: A review. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 2, p. 194–222, 2011.

TERENZI, F.; DÍAZ-GUERRA, M.J.; 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**, v. 270, n. 11, p. 6017-21, 1995.

TRICOIRE, H.; MOLLER, M.; CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. **Reprod Suppl**, v. 61, p. 311– 321, 2003.

TRINCHIERI, G. Function and clinical use of interleukin-12. **Curr Opin Hematol**, v. 4, p. 59-66, 1997.

TSUTSUMI, V.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. **Am J Pathol**, v. 130, p. 112–119, 1988.

TSUTSUMI, V.; MENA-LOPEZ, R.; ANAYA-VELAZQUEZ, F.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. **Am J Pathol**, v. 117; p. 81–91, 1984.

TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. **Arch Med Res**, v. 37, n. 2, p. 210-20, 2006.

VELAZQUEZ, C.; SHIBAYAMA-SALAS, M.; AGUIRRE-GARCIA, J.; TSUTSUMI, V.; CALDERON, J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. **Parasite Immunol**, v. 20, p. 255–262, 1998.

WALSH, A. J. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. **Rev Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 228-238, 1986.

WALSH, J. A. Epidemiology. In: RAVDIN, J. I. (Ed.). *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. New York: Churchill Livingstone, 1988. p. 91-126.

WANG, W.; KELLER, K.; CHADEE, K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. **Infect Immun**, v. 60, n.8, p. 3169–3174, 1992.

WANG, W.; KELLER, K.; CHADEE, K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. **Immunology**, v. 83, p. 601–610, 1994.

WILSON, M.S.; MENTINK-KANE, M.M.; PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; THOMPSON, R.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, p. 148–154, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Health Statistics 2010**. Geneve: WHO Press, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Amoebiasis. WHO Weekly Epidemiologic Record*, Geneva, v. 72, p. 97–100, 1997.

WU-GUO, DENG; SHAO-TZU, TANG; HUI-PING TSENG; KENNETH K., WU. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. **Blood**, v. 15, n. 108(2), p. 518–524, 2006.

XIMÉNEZ, C.; MORÁN, P.; ROJAS, L.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 6, p. 1023-1032, 2009.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. **Curr Mol Med**, v.1, p. 287–296, 2001.

YONEYAMA, S.; HASHIMOTO, S.; HONMA, K. Seasonal changes of human circadian rhythms in Antarctica. **Am J Physiol**, v. 277, p. 1091–1097, 1999.

YOSHIDA, K., et al. Biotransformation of nitric oxide, nitrite and nitrate. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 52, p. 103–115; 1983.

YU, H.-S.; TSIN, A. T. C.; REITER, R. J. Melatonin: history, biosynthesis and assay methodology. In: YU, H.-S.; REITER, R. J. (Ed.). **Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 1-17.

YU, Q.; MILLER, S.C.; OSMOND, D.G. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. **J Pineal Res**, v. 29, p. 86-93, 2000.

ZAVODNIK, I.B.; DOMANSKI, A.V.; LAPSHINA, E.A.; BRYSEWSKA, M.; REITER, R.J. Melatonin directly scavenges free radicals generated in red blood cells and a cell-free system: chemiluminescence measurements and theoretical calculations. **Life Sci**, v. 79, p. 391–400, 2006.