UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA ORAL NA
EVOLUÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM
RATOS WISTAR INFECTADOS COM A CEPA Y DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Fabricia Helena Santello

Ribeirão Preto
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA ORAL NA
EVOLUÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM
RATOS WISTAR INFECTADOS COM A CEPA Y DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para a obtenção do
título de mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Ribeirão Preto
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTELLO, FABRICIA HELENA

Efeito da administração de melatonina oral na evolução da doença de Chagas experimental em ratos Wistar infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Ribeirão Preto, 2005

101p.: il.;30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prado Jr., José Clóvis

1. Chagas' disease, 2. Melatonin, 3. Citokines, 4. Pineal gland, 5. Immune system,
6. Immunologyc assays

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract	iv
1.INTRODUÇÃO.....	p.8
1.1 Doença de Chagas.....	p.8
1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune.....	p.11
1.3 Glândula pineal.....	p.16
1.4 Melatonina.....	p.18
1.5 Melatonina e o Sistema Imune.....	p.22
2.OBJETIVO.....	p.25
3.MATERIAL E MÉTODO.....	p.26
3.1 Animais e infecção por <i>T. cruzi</i>	p.26
3.1.1 Animais utilizados.....	p.26
3.1.2 Eutanásia dos animais.....	p.27
3.1.3 Dias de Experimento.....	p.28
3.1.4 Cepa de <i>T. cruzi</i>	p.28
3.2 Administração de melatonina.....	p.29
3.3 Parasitemia.....	p.29
3.4 Leucograma.....	p.29
3.5 Coleta do sangue.....	p.30
3.6 Histopatologia.....	p.30
3.7 Intensidade do parasitismo tecidual.....	p.30
3.8 Ensaio Imunológico.....	p.31
3.8.1 TNF α e IFN- γ	p.31
3.8.2 IL 12 e IL2.....	p.32
3.9 Curva de mortalidade.....	p.33

3.10 Forma de análise dos resultados.....	p.33
4. RESULTADOS.....	p.34
4.1 Parasitemia.....	p.34
4.2 Contagem Total de Glóbulos brancos.....	p.35
4.3 Contagem Diferencial de Glóbulos brancos.....	p.36
4.4 Peso Cardíaco.....	p.39
4.5 Peso dos Animais.....	p. 40
4.6 Curva Mortalidade.....	p.41
4.7 Análise Imunológica	p.41
4.7.1 IL-2.....	p.41
4.7.2 IL-12.....	p.42
4.7.3 IFN- γ	p.43
4.7.4 TNF- α	p.44
4.8 Análise Histopatológica.....	p.45
4.8.1 Grupo Não Infectado Não Tratado com Melatonina	p.45
4.8.2 Grupo Não Infectado Tratado Concomitantemente ao Inóculo.....	p.46
4.8.3 Grupo Não Infectado Tratado 7 Dias Antes do Inóculo.....	p.47
4.8.4 Grupo Infectado Não Tratado com Melatonina.....	p.48
4.8.5 Grupo Infectado Tratado com Melatonina Concomitantemente ao Inóculo....	p.56
4.8.6 Grupo Infectado Tratado com Melatonina 7 Dias Antes do Inóculo.....	p.64
4.9 Parasitismo tecidual	p.72
5. DISCUSSÃO.....	p.73
6. CONCLUSÃO.....	p.82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	p.84

RESUMO

SANTELLO, FABRICIA HELENA. **Efeito da administração de melatonina oral na evolução da doença de Chagas experimental em ratos Wistar infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 2005.** 101p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A doença de Chagas é um problema de saúde pública, com dados preocupantes do número de pessoas contaminadas e que ainda irão se contaminar. O objetivo desta investigação é avaliar o efeito da melatonina sobre o sistema imune na infecção chagásica experimental. Produzida pela glândula pineal possui várias ações fisiológicas, entre elas a mais importante, controlar o ritmo circadiano na grande maioria dos seres vivos. A melatonina foi administrada por via oral, tendo seu efeito avaliado através da quantificação dos níveis parasitêmicos, leucograma, histopatologia cardíaca e por ensaios imunológicos como IFN, TNF, Il-2, Il-12. A parasitemia foi drasticamente diminuída nos animais infectados e tratados com melatonina refletindo em uma diminuição ou quase ausência da presença de ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas desses animais. A melatonina promoveu uma leucocitose com aumento dos neutrófilos e linfócitos. Não foi observada morte em nenhum dos grupos infectados tratados ou não com melatonina. Os ensaios imunológicos mostraram que as citocinas quantificadas apresentaram uma ação imunoestimuladora aumentada em relação aos grupos infectados que certamente foi responsável pela diminuição da carga parasitária sanguínea e tecidual. Dessa forma conclui-se que a melatonina exerceu um papel importante imunoestimulador agindo sobre o eixo HHA que se refletiu em uma melhor resposta do hospedeiro durante o curso da infecção experimental.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, melatonina, citocinas, glândula pineal, sistema imune, ensaios imunológicos.

ABSTRACT

SANTELLO, FABRICIA HELENA. **Efeito da administração de melatonina oral na evolução da doença de Chagas experimental em ratos Wistar infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 2005.** 101p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Chagas' disease is still considered a major problem in public health, with an alarming number of bearing parasite people and the risk of future contamination. The aim of this investigation is to evaluate a possible immunostimulatory effect of melatonin during the evolution of the experimental disease in Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. Produced by pineal gland, it has a wide range of physiological functions, among them to control the circadian rhythm in most of the species. In this work melatonin was orally administrated being its effects evaluated by the number of blood trypomastigotes, leucogram, heart hystopathologyn and immunologic assays such IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12. Parasitemia was drastically reduced in melatonin treated infected animals consequently leading to a drop in the number of amastigoter burdens being sacarcely found among heart fibers. Melatonin promoted a leucocytosis with enhanced levels of neutrophils and lymphocytes. Absence of death was observed in all groups. Immuno-enhanced effects were observed with assays of IL-2, IL12, IFN- γ and TNF- α . when compared to non treated animals. According to our data we conclude that Melatonin displayed an immunostimulatory effect over the HHA axis, reducing blood and tecidual parasite consequently avoiding parasite replication during the evolution of the experimental infection in rats.

Key words: Chagas'disease, Melatonin, Citokines, Pineal gland, Immune system, Immunologyc assays

1- INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma das mais sérias doenças parasitárias da América Latina, com impacto social e econômico de peso bem maior do que os efeitos combinados de outras doenças parasitárias como malária, leishmaniose e esquistossomose. Aproximadamente 13 milhões de pessoas estão infectadas, com 3 a 3,3 milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual de 200 mil casos em 15 países. A importância dessa endemia se reflete no sentido econômico onde é responsabilizada pelas taxas de aposentadoria precoce, como consequência direta da doença (WHO, 2003).

Tem por agente etiológico, o flagelado digenético *Trypanosoma cruzi*. O triatomíneo após realizar a hematofagia em um hospedeiro, libera as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes ou urina que penetram através da solução de continuidade proliferando-se ativamente no interior de macrófagos. Findo este ciclo, as células parasitadas se rompem, liberando milhares de tripomastigotas que ganham a circulação sendo sua detecção no sangue periférico uma característica da fase aguda da doença. Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção é controlada através da resposta imune dirigida contra o parasita, determinando o desaparecimento dos tripomastigotas sanguíneos. Estes indivíduos passam para uma fase assintomática onde somente exames sorológicos podem indiretamente detectá-los. Dependendo do tipo da cepa e estado imunológico do hospedeiro dentre outros fatores, uma proporção deles desenvolve doença cardíaca e/ou digestiva vários anos após a contaminação, enquanto a maioria permanece assintomática (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1991).

O ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* ocorre na natureza entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. O homem passou a fazer parte do ciclo de transmissão

quando invadiu o ecótopo natural compreendido pelos vetores e seus hospedeiros mamíferos. Dessa forma, os vetores passaram a invadir as habitações humanas colonizando os mais variados locais como buracos ou fendas em paredes, atrás de quadros ou pintura solta. Nota-se maior incidência em casas de condições precárias como as de pau a pique, sapé, madeira ou barro, sendo mais freqüente, nas zonas rurais e entre a população de baixa renda (KIRCHHOF, 1995).

Os triatomíneos possuem hábitos geralmente noturnos e durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados ingere os tripomastigotas circulantes, os quais após multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo destes, são eliminados em suas fezes podendo infectar novos hospedeiros vertebrados.

A maior parte dos casos de infecção em seres humanos, ou outros vertebrados é produzida pelo contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae (BRUMPT, 1912; CHAGAS, 1909), contaminados por *T. cruzi* (HOARE, 1972). Esta via pode ser considerada como a principal maneira de transmissão da doença de Chagas nas Américas (DIAS, 2000).

Outros mecanismos de infecção são: transmissão vetorial, congênita, amamentação e via transfusional. Existem também formas de transmissões excepcionais como: transmissão acidental em laboratório, por transplantes de órgãos, oral e sexual (BRENER *et al.*, 2000).

T. cruzi, agente etiológico da doença, mostra uma patogenia especialmente determinada por características próprias do hospedeiro e da população infectante. Assim, o curso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores como a temperatura ambiental, idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas e morfológicas da cepa infectante e fatores externos (BRENER *et al.*, 2000). *T. cruzi*, por suas características biológicas e genéticas, constitui-se de

cepas ou subespécies que podem ter comportamentos peculiares quando inoculadas em animais experimentais (BRENER, 1965).

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

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

A doença de Chagas, pode ser avaliada experimentalmente através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, podendo

reproduzir nos mesmos os distintos aspectos patológicos da doença humana (BRENER & CHIARI, 1963; BORGES *et al.*, 1982; BORGES *et al.*, 1992a; CARDILLO *et al.*, 1996; PRADO *et al.*, 1998; PRADO *et al.*, 1999; BRENER *et al.*, 2000; DOST *et al.*, 2002). Como consequência da grande utilização de roedores em pesquisa, permitiu uma detalhada descrição celular, molecular e fenomenológica disponível para o sistema imune de mamíferos. Com relação à doença de Chagas, o estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados por *T.cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, muito semelhante às causadas pela doença humana (BRENER *et al.*, 2000).

A doença de Chagas pode também estar associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. É de amplo conhecimento o envolvimento da resposta imune celular Th1 para o controle da doença de Chagas em sua fase inicial. Assim, indivíduos chagásicos aidéticos podem apresentar reativação da doença, provavelmente devido à supressão da imunidade celular característica de indivíduos imunodeprimidos (COURA & CASTRO, 2002; BRITO *et al.*, 2003).

1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune

Grande parte das manifestações clínicas da doença de Chagas deve-se a ativação das respostas imunes dirigidas ao parasita (ALIBERT *et al.*, 1996). Sabe-se, que a grande maioria das infecções que envolvem a participação de agentes infecciosos parasitários, virais ou bacterianos, causam no hospedeiro um estado de estresse, levando a uma imunossupressão, que na realidade nada mais é que uma forma do agente etiológico evadir-se da resposta imune e estabelecer nesse novo ambiente, condições necessárias para sua perpetuação.

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T.cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas. Em consequência, o parasita passa a ser continuamente combatido, e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. Hoje está bem estabelecido que células e mecanismos efetores do sistema imune são responsáveis tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelas lesões locais resultantes das atividades antiparasitárias.

A resposta imune gerada na fase aguda é responsável pela redução da parasitemia. Essa resposta, porém, não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro (BRENER *et al.*, 2000). O controle dos anticorpos sobre a infecção chagásica depende de variáveis como a idade do hospedeiro, sexo e condições experimentais. A resposta inflamatória, ao lado das lesões celulares e das alterações da matriz extracelular, constitui um dos processos patológicos fundamentais da doença de Chagas (LOPES, 2002).

Estudos em modelos experimentais demonstram que os anticorpos são componentes importantes nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra *T. cruzi* (KIERZENBAUM & HOWARD, 1976; KRETTLI & BRENER, 1976). Em 1982, KRETTLI e BRENER introduziram a pesquisa de anticorpos líticos, e verificaram que existe uma dissociação entre os anticorpos envolvidos no diagnóstico da doença de Chagas e os que participavam da resistência contra o parasita. Esses últimos podiam ser detectados através da lise mediada por complemento e só se ligavam às formas vivas de tripomastigotas, desta maneira a dosagem de anticorpos líticos se tornou uma excelente ferramenta para a avaliação de cura.

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito. Este último demonstrou-se altamente citotóxico contra as formas epimastigotas desse parasita (THOMSON *et al.*, 1999). Quando os macrófagos são ativados, estes liberam o óxido nítrico que está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, como a vasodilatação sangüínea, agregação de plaquetas e neurotransmissão (MONCADA *et al.*, 1991). É considerado também como uma importante molécula efetora antimicrobica em macrófagos contra patógenos intracelulares como *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, por *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI *et al.*, 1996). Tipicamente, ocorre em macrófagos a secreção da citocina interleucina 12 (IL-12), que ativa as células NK (*natural killer*) a produzirem a citocina interferon gama (IFN- γ) (ALIBERTI *et al.*, 1996). Esta age reciprocamente sobre macrófagos, ativando-os para atividade microbica (REED, 1995; GAZZINELLI, *et al.*, 1992). A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzida por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1988), participa dessa interação de forma sinérgica tanto como IL-12 como IFN- γ (OSWALD *et al.*, 1992). O papel protetor do IFN- γ no início da infecção foi amplamente demonstrado por REED em 1995. Esses estudos foram confirmados utilizando camundongos geneticamente deficientes do IFN- γ , camundongos estes susceptíveis à infecção (ROTTENBERG *et al.*, 1996).

A ativação de diferentes tipos de células do sistema imune e moléculas solúveis por elas produzidas desempenha participação direta no controle da carga parasitária durante a fase aguda da infecção (ALIBERTI *et al.*, 1999). *T. cruzi* é capaz de induzir prontamente a ativação/produção de proteínas e enzimas efetoras da imunidade inata

natural. Porém, a forma tripomastigota consegue resistir ao ataque da via alternativa do complemento, permitindo uma infecção bem sucedida, nas células do hospedeiro.

O papel dos macrófagos, na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecido (TALIAFERRO & PIZZI, 1955; MACKANESS, 1969). Os macrófagos e as células T desempenham uma função importante no controle da infecção chagásica (NATHAN et al., 1979). Mesmo exercendo um papel crucial na função efetora no controle da resposta imune do hospedeiro, os macrófagos representam provavelmente, uma das primeiras células envolvidas na infecção chagásica, sendo capazes de abrigar o parasita e permitir sua multiplicação.

O mais importante sinal para a ativação dos macrófagos é o IFN- γ , que tem sido considerado como uma importante citocina para a destruição de *T. cruzi* (PLATA et al., 1984; MURRAY et al., 1985). Outras substâncias como o TNF- α e fatores inespecíficos, como o LPS (lipopolissacarídeos), podem estar envolvidos no processo de ativação de macrófagos (ALCINA & FRESNO, 1987). Isso ocorre porque *T. cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, induzindo a produção de IL-12, que além de estimular a proliferação de linfócitos T, ativa as células *Natural killer* (NK) a produzirem IFN- γ , cuja função é acionar os macrófagos para a atividade parasiticida (ALIBERTI et al., 1996; TRINCHIERI, 1998; OLIVEIRA et al., 2000; GALVÃO DA SILVA et al., 2003). Dessa forma TNF- α , produzido pelos macrófagos durante a infecção, interage de forma sinérgica tanto com IL-12 como IFN- γ , ativando os macrófagos a expressarem a enzima óxido nítrico (NO) sintetase induzida e a produção de NO (MILLER et al., 2002).

O controle da fase aguda da infecção está relacionado com a resposta celular, onde as células T exercem um efeito antiparasita precoce e anterior à produção de anticorpos (TRISCHMANN, 1984).

As interleucinas têm um papel fundamental durante a infecção por *T. cruzi*. O IFN- γ é capaz de inibir *in vitro* o seu desenvolvimento (PLATA et al., 1984), e, *in vivo* é capaz de diminuir a parasitemia e prolongar a sobrevivência de animais infectados (PLATA et al., 1987).

O óxido nítrico é considerado importante molécula efetora antimicrobiana contra patógenos intracelulares incluindo *Leishmania major* (LIEW et al., 1991; EVANS et al., 1996), *T. gondii* (ADAMS et al., 1990) e *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992; JAMES, 1995).

Na fase aguda da infecção, muitos neurônios periféricos são destruídos (KOBERLE, 1968), contribuindo para a patogenia da cardiopatia crônica, megaesôfago e megacólon (KOBERLE, 1968; OLIVEIRA, 1995; ROSSI & BESTETTI, 1995).

Nos últimos anos, ainda que a maioria dos trabalhos relativos à resposta inflamatória na doença de Chagas continuasse a se preocupar basicamente com a miocardite, desenvolveram-se alguns estudos sistematizados, sobre a resposta inflamatória no tubo digestivo de chagásicos crônicos (ADAD et al., 1991; CAMARGOS et al., 2000).

Alguns autores relatam que pesquisas desenvolvidas nos últimos anos permitem estabelecer: 1. existe mimetismo molecular entre o parasita e antígenos do hospedeiro; 2. no decorrer da infecção, aparecem auto-anticorpos que reconhecem epítomos cardíacos durante a fase crônica da doença; 3. a transferência passiva de linfócitos provenientes de animais infectados em hospedes singênicos, empregando células isoladas de linfonodos, baço ou linfócitos cultivados, produz lesões inflamatórias cardíacas e neurológicas; 4. é possível induzir lesões cardíacas e nervosas pela transferência de linfócitos de animais infectados para animais singênicos, virgens de infecção; 5. os linfócitos B, dos infiltrados inflamatórios do coração, elaboram anticorpos contra antígenos miocárdicos; 6. clones de linfócitos T, isolados a partir de

biópsias cardíacas humanas, mostram reatividade com antígenos cardíacos (LAGUENS et al., 1999).

1.3 Glândula Pineal

A glândula pineal vem sendo, ao longo dos séculos, fonte de múltiplas especulações, por vezes místicas, ora científicas. É considerada o terceiro olho pelos hindus, e teve sua anatomia descrita no século II por GALENO. No século XVII, DESCARTES chocou os teólogos, atribuindo a esta glândula a sede da espiritualidade, acreditando que a alma humana ali se instalasse. Apesar de ser a primeira glândula a se formar, sendo no homem, identificada já na terceira semana após concepção, é a última a ter segredos desvendados, após sofrer extensas modificações durante sua evolução (MOORE, 1990).

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

Derivada de células endodimárias do teto diencefálico caudal, o qual não está em contato direto com o terceiro ventrículo, mas ligada ao diencefalo por um pedúnculo de comprimento variável, a pineal localiza-se entre a habênula e a comissura posterior. Possui extensas conexões nervosas com a retina, o hipotálamo e o gânglio cervical superior. Sua estrutura histológica sugere funções neuro-secretoras, porém, contém ainda, células gliais e terminações nervosas. De fato, em vertebrados inferiores, como peixes e anfíbios, as células da pineal têm função semelhante ao olho, ou seja, são

extremamente fotossensíveis; nos vertebrados superiores, todos os vestígios desta função foto-receptora desapareceram (REICHLIN, 1992).

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

A inervação é crucial ao funcionamento da glândula. As fibras nervosas terminam junto aos espaços intersticiais ou diretamente nas membranas celulares dos pinealócitos. O endotélio da pineal é fenestrado e permite a entrada e saída de grandes moléculas para o interior do espaço intersticial, diferindo assim do restante do sistema nervoso central, pela completa ausência de barreira hemato-encefálica. Todas as funções neuro-endócrinas desta glândula são mediadas por receptores β -adrenérgicos. (KLEIN, 1978).

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

Um ponto interessante e único na fisiologia da glândula pineal é a relação existente entre a periodicidade do ciclo luz/escuro e a secreção de indóis pela mesma.

Isso se observa quando há um prolongamento do fotoperíodo, onde a iluminação contínua provoca a redução na produção e secreção de melatonina. Este efeito fótico só ocorre quando a via nervosa que conecta a retina e a pineal está intacta. Existem várias evidências da comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino. A glândula pineal é um importante elo destes sistemas, já que estudos recentes têm mostrado a ação da melatonina sobre a resposta imune, frente a diferentes infecções parasitárias (REYES, 1993).

1.4 Melatonina

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

A sua síntese inicia-se a partir do triptofano, envolvendo várias enzimas e compostos indol. A etapa limitante para a síntese de melatonina é a atividade das enzimas N-acetiltransferase e a hidroxindol-orto-metiltransferase (HIOMT). Supõe-se que cerca de 25% da secreção de melatonina seja de origem extra-pineal, sendo impreciso o local de sua produção ectópica (LEWY, 1983). A HIOMT também pode ser encontrada na retina e nas hemácias (CARDINALLI & ROSNER, 1971; ROSENGARTEN et al., 1972).

A produção de melatonina é maior durante a noite, sendo sua concentração, no interior da pineal, inversa à de seu precursor, a serotonina. Durante o dia, os níveis de

melatonina são muito baixos, começam a aumentar no início da noite e alcançam seu pico máximo ao redor de meia-noite, caindo a seguir independente do estado de vigília (REICHLIN, 1992). A duração da secreção de melatonina depende do tempo de exposição ao escuro, isto é, as suas concentrações são maiores no inverno do que no verão. A inibição da melatonina pela luz é diretamente proporcional à sua intensidade. No entanto, a exposição ao escuro, durante o dia, não aumenta as concentrações plasmáticas de melatonina (LEWY, 1983). Quando os níveis de melatonina estão elevados, também aumentam os de N-acetil-transferase, sendo o inverso também verdadeiro. Em períodos de privação luminosa, os níveis desta enzima se alteram drasticamente, elevando seus valores entre 25 e 100 vezes (KLEIN, 1978). Além da luz, a ativação do sistema nervoso simpático, a imobilização e o estresse hipoglicêmico aumentariam as concentrações das enzimas que participam da síntese de melatonina no interior da pineal (REICHLIN, 1992).

A sua liberação para a circulação se dá imediatamente após a ausência de luz e, na presença desta, é abruptamente interrompida. Pode haver, entretanto, alguns picos isolados de melatonina, que são independentes das mudanças de luz ou do estresse. A sua excreção se faz por via urinária, através do metabólito sulfato 6-OH-melatonina e depende de vários fatores como o sono, a dieta, a postura e a atividade física (KLEIN, 1978).

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

A diversidade dos receptores e suas diferentes distribuições, cerebral e em órgãos extra-cerebrais sugerem múltiplas atividades funcionais. Os receptores de

melatonina estão ligados a duas classes diferentes de proteínas, o que lhes confere complexidade e explica tantas funções fisiológicas deste neurohormônio ao longo de todo o organismo. As funções dos receptores são recentes e novas descobertas podem trazer outras funções para os mesmos (DELAGRANGE et al., 2003, WITT-ENDERBY et al, 2003).

Além do sistema nervoso central, que se presume ser o alvo da ação da melatonina, detectaram-se receptores em outros órgãos periféricos, como os olhos, o baço e a supra-renal (DUBOCOVICH, 1985; DUBOCOVICH & TAKAHASHI, 1987; NILES, 1989; LOPEZ-GONZALEZ et al., 1991; PANG et al., 1991; PERSENGIEV et al., 1991; YU et al., 1991). Além disso, já foram descritos receptores de melatonina nas gônadas e nas células ovarianas (COHEN et al., 1978).

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

Por ser um mensageiro endógeno da escuridão, sua síntese depende do fotoperíodo e mostra variações sazonais. É sintetizada à noite sobre condições ambientais normais, sendo o ritmo de secreção gerenciado pelo núcleo supraquiasmático e controlado pelo ciclo claro/escuro. A melatonina pode ser considerada o ponteiro do relógio biológico (MAESTRONI, 2001; TAN et al., 2003).

No homem, os níveis de melatonina diminuem intensamente com a idade. As concentrações plasmáticas noturnas situam-se em torno de 250pg/ml em crianças de 1 a 3 anos, atingindo 120pg/ml na adolescência e declinando para 20pg/ml entre 50 e 70 anos de idade. Os níveis diurnos de melatonina são idênticos em todas as idades, ou seja, ao redor de 4 a 10 pg/ml (CAVALLO, 1992).

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

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

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

1.5 Melatonina e o Sistema Imune

Os efeitos exercidos pela melatonina nos parâmetros imunes são diferentes, e dependem de vários fatores, incluindo dose e via de aplicação, espécies, sexo, idade do animal (aqui se deve ressaltar o estágio de maturação e a forma de ativação do sistema imune, decorrentes da idade), assim como estação do ano, ritmo circadiano das imunidades celular e humoral, função da glândula pineal, condições de estresse, acompanhamento do processo experimental, etc (SKWARLO, 2002).

Os mecanismos pelos quais a melatonina influencia as funções do sistema imune são complexos, mas incluem participação de mediadores (opióides endógenos, citocinas, hormônios, ligação com zinco) assim como, sítios de ligação específicos em células imunes (SKWARLO, 1996).

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

A ação imoestimuladora da melatonina tem sido confirmada e estendida para uma variedade de espécies animais. Sua ação sobre o sistema imune pode estar relacionada com a regulação da produção de citocinas de células imunocompetentes. Em células mononucleares humanas do sangue periférico, em condições fisiológicas, a melatonina tem mostrado estimular a produção de IL-1, IL-2, IFN-gama, IL-6 e IL-12. O aumento da produção de IL-6, por exemplo, está relacionado com a ativação de monócitos pela melatonina, onde esta última age nas células linfóides humanas,

causando uma resposta do tipo TH-1, a qual está também associada ao aumento da produção de IL-12 (GARCIA-MAURINO et al., 1999).

Fisiologicamente, o pico noturno de melatonina tem sido associado com alto balanço IFN- γ / IL-10, o que mostra uma relação do ritmo da melatonina interagindo positivamente com a ritmicidade do balanço Th1/Th2. (GARCIA-MAURINO et al., 1999 e 1997; MORREY et al., 1994). Um estudo muito interessante, realizado com portadores do vírus HIV-1, observou um paralelo entre a redução da secreção de melatonina e a progressão da doença e uma correlação com os níveis séricos de IL-12 nestes pacientes (NUNNARI et al., 2003).

BEN-NATHAN et al. (1995) testaram o efeito protetor da melatonina subcutânea contra o vírus da encefalite e observaram uma redução considerável na mortalidade e na viremia dos ratos tratados. Outro estudo mostrou o efeito da melatonina sobre a encefalite autoimune através de sua ação sobre moléculas intercelulares de adesão do tipo 1 (KANG et al., 2001).

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

A proliferação de esplenócitos foi avaliada in vitro na presença ou não de melatonina em células T. Os resultados sustentam a hipótese do efeito direto da melatonina sobre a proliferação de esplenócitos, em decorrência da alta afinidade da melatonina a receptores nos esplenócitos. Os estudos indicam que independente do

fotoperíodo, a melatonina exerce efeito direto nos esplenócitos, potencializando a função imune. (DRAZEN et al., 2000)

MAESTRONI (2001) avaliou a presença de receptores de membrana celular e nuclear para melatonina em células T-helper, e observou que a ativação destes receptores aumentam a liberação de citocinas de células T-helper do tipo 1, como IFN- γ e IL-2. A melatonina também pode aumentar a produção de IL-1, IL-6 and IL-12 em monócitos humanos. Estes mediadores podem conter o estresse induzido pela imunodepressão e proteger camundongos contra a encefalite viral letal, doenças bacterianas e choque séptico.

2. OBJETIVO

O trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos terapêuticos, sobre o sistema imune, da administração oral da melatonina em ratos *Wistar* machos, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, utilizando os seguintes parâmetros:

- parasitemia;
- leucograma;
- histopatologia do coração
- dosagem de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-12 e IL-2;
- pesagem do coração.

3– MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais e Infecção com *T. cruzi*

3.1.1. Animais utilizados

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

Grupo Controle

MSMNI - Machos sem suplementação de melatonina e não infectados (n = 5)

MCMNI 1 - Machos com suplementação de melatonina na dose de 5mg/kg oral, concomitante ao inóculo e não infectados (n = 5)

MCMNI 2 - Machos com suplementação de melatonina na dose de 5mg/kg oral, 7 dias antes do inóculo e não infectados (n = 5)

Grupo Infectado pela Cepa Y de *T. cruzi*

MSMI - Machos sem suplementação de melatonina e infectados (n = 5)

MCMI 1 - Machos com suplementação de melatonina na dose de 5mg/kg oral, concomitante ao inóculo e infectados (n = 5)

MCMI 2 - Machos com suplementação de melatonina na dose de 5mg/kg oral, 7 dias antes do inóculo e infectados (n = 5)

Fase Aguda					
Dias de experimento após	5°	9°	12°	15°	21°
Grupos	Número de animais utilizados				
MSMNI	5	5	5	5	5
MCMNI 1	5	5	5	5	5
MCMNI 2	5	5	5	5	5
MSMI	5	5	5	5	5
MCMi 1	5	5	5	5	5
MCMi 2	5	5	5	5	5

Na fase aguda foram analisados os seguintes parâmetros: parasitemia, leucograma, histopatologia do coração e dosagens de: TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-2.

Fase Crônica			
Dias de experimento após	30°	45°	60°
Grupos	Número de animais utilizados		
MSMNI	5	5	5
MCMNI 1	5	5	5
MCMNI 2	5	5	5
MSMI	5	5	5
MCMi 1	5	5	5
MCMi 2	5	5	5

Na fase crônica foram analisados os seguintes parâmetros: parasitemia, leucograma, histopatologia do coração e dosagem de: TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-2.

3.1.2 Eutanásia dos animais

Os animais foram mortos, após anestesia, por decapitação. O anestésico causa inconsciência em função de sobredosagem, provocando uma ausência de percepção das sensações, numa relação dose-efeito. A decapitação é um método rápido, eficaz e seguro. Tudo isso, visando um mínimo de dor, medo e angústia. A eutanásia é realizada por decapitação para evitar que outras manipulações aumentem o efeito do estresse, provocando falsos resultados na dosagem de interleucinas e das imunoglobulinas.

3.1.3 Dias de Experimento

Os experimentos foram realizados em dias pré-determinados: no 5º, 9º, 12º, 15º e 21º, após o inóculo infectante, que corresponderá à fase aguda da infecção; e no 30º, 45º e 60º, período de cronificação da doença. Estes dias foram escolhidos baseados no perfil da curva parasitêmica, onde o pico de parasitemia ocorre, normalmente, entre o 12º e 14º dias, após o inóculo.

3.1.4 Cepa de *T.cruzi*

Foram inoculadas $1,5 \times 10^5$ formas da Cepa Y, via intraperitoneal. Utilizamos a cepa Y de *T.cruzi* isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), através do xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos Swiss não isogênicos, através de repiques semanais de sangue infectado. Ressaltamos que o estudo da cepa Y já está bem preconizado em diferentes modelos experimentais, inclusive em ratos, não variando muito de hospedeiro para hospedeiro (UYEMURA *et al.*, 1995). A cepa Y possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoces, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA & SCORZA, 1972). Em ratos, o padrão da curva parasitêmica se mantém semelhante aos dos roedores de menor porte, com um pico compreendido entre o 12º e 14º dias, onde então, os parasitas desaparecerão da circulação iniciando-se a fase crônica (ANDRADE *et al.*, 1970; ANDRADE, 1974; UYEMURA *et al.*, 1995).

3.2 Administração da melatonina

A melatonina foi administrada na dose de 5mg/kg via oral, diluída em água (5%p/v) e nos grupos controle somente o veículo, seguindo os padrões utilizados no estudo de doença auto-imune (KANG et al, 2001). O tratamento foi realizado pela manhã, pois é neste período onde os níveis plasmáticos de melatonina estão mais baixos. O período de tratamento foi diferente para dois grupos de animais, onde o primeiro e o seu controle receberam melatonina 7 dias antes do inóculo e o segundo grupo e o seu controle receberam melatonina no dia da infecção. O tratamento foi realizado até o 21º dia da infecção.

3.3 Parasitemia

Decorridos os dias de ambientalização, os animais do grupo infectado foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas. A contagem dos parasitas foi feita pelo método de BRENER, (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5µl de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22 x 22mm. Determina-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos, selecionados em várias áreas do preparado. O número encontrado é multiplicado por um fator, calculado para cada microscópio e objetiva, que leva em consideração o número de campos microscópios existentes na área da lamínula.

3.4 Leucograma

A contagem global de leucócitos foi realizada através do uso da solução de Turk e contagem em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada através de extensões sanguíneas previamente fixadas com álcool metílico e coradas por Giemsa.

3.5. Coleta de sangue

Após a morte dos animais foi coletado cerca de 2,0ml de sangue em um tubo plástico, para realização dos esfregaços sangüíneos para contagem diferencial de leucócitos e determinação da parasitemia. Para as análises imunológicas foram coletadas alíquotas de aproximadamente 200µl de sangue em frasco sem anticoagulante para obtenção de soro.

3.6 Histopatologia

Em cada dia do experimento, foi retirado o coração dos animais. O órgão foi pesado em balança eletrônica (Mettler H10W), lavado em solução fisiológica 0,9%, fixado em formol 10 % tamponado e após 24h mantido em álcool 70%, até sua inclusão em parafina. Confeccionamos cortes histológicos de 6µm que foram corados por Hematoxilina-Eosina. A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70µm, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi* (CAMARGOS *et al.*, 2000). Os cortes foram examinados em microscópio óptico com aumento de 1000x (imersão) (MELO & BRENER, 1978).

3.7. Intensidade do Parasitismo Tecidual

O grau de parasitismo foi estimado através da análise qualitativa, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X). Para esta análise foram utilizados 5 animais de cada grupo em estudos. Consideramos como (+++++) os cortes em que mais de 50 a 100% dos campos apresentaram-se parasitados, (++++) cortes onde foram encontrados ninhos de amastigotas em 25% a 50% dos campos, (++) cortes que apresentaram entre 12,5% a 25% de positividade nos

campos analisados, (+) quando foram encontrados menos de 12,5% dos campos parasitados e (-) ausência de ninhos de amastigotas (CASTRO & BRENER, 1985).

3.8 Ensaios Imunológicos

3.8.1 Dosagens de TNF α e IFN- γ

No dia 1, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de diluição do anticorpo de captura anti-citocinas para ratos preparado na concentração de 1:250 em tampão de sensibilização – carbonato de sódio 0,1M pH 9,5 . A placa foi incubada por 16-20 horas à 4°C. No dia 2, as placas foram lavadas cinco vezes com 300 μ L/poço de tampão de lavagem (PBS + Tween 0,05%) com auxílio de pipeta multicanal para remover a solução de anticorpo de captura. As ligações não específicas foram bloqueadas pela adição de 200 μ L/poço de tampão bloqueador (PBS com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) pH 7,0) seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após o tempo de bloqueio, as placas foram novamente lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e adicionados os padrões de citocinas recombinantes (TNF α – 45000pg/ml ou IFN- γ - 76ng/ml) na quantidade de 100 μ L/poço diluídos em tampão bloqueador Tween (PBS Tween 0,05% com SBF 10% pH 7,0) na concentração de 2000 μ g/mL a 31,25 μ g/mL para ambas as citocinas em 7 poços da placa em duplicata e oitavo com tampão de bloqueio apenas, para a confecção da curva padrão. Um ponto para o branco foi incluído. Nos outros poços, foram pipetados 100 μ L das amostras experimentais em duplicata. Após esse processo as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e adicionados os anticorpos biotinizados anti-citocinas 100 μ L/poço, diluídos em tampão bloqueador Tween na concentração de 1:250, nova incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos, e novo ciclo de lavagem foi realizado. A revelação enzimática foi feita pela adição de 100 μ L/poço de streptavidina-peroxidase

(HRP) diluída em tampão bloqueador Tween na proporção de 1:250 e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novo ciclo de sete lavagens, foi adicionado substrato revelador tetrametilbenzidina (TMB) 100µL/poço, incubando novamente por 30 minutos, protegendo da luz, e parando a reação com a adição de 50µL de H₃PO₄ 1M. As densidades ópticas (D.O) das placas foram lidas em leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) em um comprimento de onda de 450 nm, os dados foram processados em programas de estatísticas e devidamente plotados e analisados . Os kits utilizados foram da empresa BD Biosciences, San Diego, U.S.A.: BD OptEIA™ SET Rat IFN-γ e BD OptEIA™ SET Rat TNFα.

3.8.2 Dosagens de IL-2 e IL-12

Foram utilizadas placas 96 poços já sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocinas para ratos. Adicionou-se às placas os padrões de citocinas recombinantes (IL-2 – 10000pg/ml ou IL-12 - 5000 pg /ml) na quantidade de 100µL/poço diluídos de forma seriada em tampão diluição padrão (15mM de azida de sódio em 25ml de solução) na concentração de 1500 pg/mL a 0 pg/mL para a IL-2 e 1000 pg/mL a 0 pg/mL para a IL-12 para ambas as citocinas em 8 poços da placa em duplicata, para a confecção da curva padrão. Um ponto para o branco foi incluído. Nos outros poços, foram pipetados 100µL das amostras experimentais em duplicata (20µL de amostra + 80µL de tampão de diluição padrão). Nas placas para IL-2 foram adicionados 50µL de anticorpo biotinilado anti-IL-2. Após esse processo as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação as placas foram lavadas quatro vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem (25 vezes concentrado – foi diluído 1:24 em água destilada). Às placas de IL-12 foi adicionado o anticorpo biotinilado anti-IL-12, e estas placas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente. A seguir o processo foi o mesmo para as duas citocinas. A revelação enzimática foi feita

pela adição de 100µL/poço de streptavidina-peroxidase (HPR) (100 vezes concentrada, contendo 3,3mM de timol por frasco de 0,125ml) diluída 1:100 em diluente para HPR (3,3mM de timol por frasco de 25ml) e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novo ciclo de quatro lavagens, foi adicionado substrato revelador tetrametilbenzidina (TMB) 100µL/poço, incubando novamente por 30 minutos, protegendo da luz, e parando a reação com a adição de 100µL de solução de parada.

As densidades ópticas (D.O) das placas foram lidas em leitor de ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) em um comprimento de onda de 450 nm, os dados foram processados em programas de estatísticas e devidamente plotados e analisados . Os kits utilizados foram da empresa BIOSOURCE, California, U.S.A.: BIOSOURCE Immunoassay Kit Rat IL-2 e BIOSOURCE Immunoassay Kit Rat IL-12 + p40.

3.9 Curva de Mortalidade

Curva de Mortalidade foi avaliada durante todo o período pós-infecção, inspecionando-se as gaiolas diariamente, e será expressa como a porcentagem acumulada de animais mortos, durante os dias após a infecção.

3.10 – Forma de análise dos resultados

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism. A comparação entre os grupos foi realizada através de teste de variância e teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

4 – RESULTADOS

4.1 Parasitemia

A contagem de parasitas circulantes no sangue dos ratos Wistar machos foi realizada pelo método de BRENER (1962) e o número de parasitas encontrados estão demonstrados na figura abaixo:

Figura1. Número de tripomastigotas sangüícolas em ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 formas/mL da cepa Y de *T.cruzi*. Comparação entre os grupos tratados e não tratados com melatonina. ($p > 0,05$)

Durante a evolução da parasitemia, os animais submetidos à suplementação de melatonina, tanto no grupo com início do tratamento concomitante ao inóculo, quanto no grupo tratado 7 dias antes do inóculo, revelaram uma drástica redução do nível de parasitas circulantes em todos os dias do experimento. O pico de parasitemia para o

grupo MCMI 1 ocorreu no 12º dia de infecção enquanto que o grupo MCMI 2 apresentou um adiantamento para o 5º dia. Fato importante é que o tratamento anterior ao inoculo mostrou-se mais efetivo na redução da parasitemia.

4.2 Contagem total de Glóbulos Brancos

A quantificação total de glóbulos brancos dos grupos não infectados e infectados, tratados e não tratados com melatonina está apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Quantificação comparativa de glóbulos brancos em Ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas/ml da cepa Y de *T.cruzi* e não infectados, tratados e não tratados com melatonina da cepa Y de *T.cruzi*. ($p < 0,05$)

Os dois tratamentos produziram um efeito sinérgico na produção de leucócitos, sendo que no tratamento prévio ocorreu uma estimulação maior, ocasionando uma leucocitose tanto para o grupo controle tratado com melatonina como para o infectado e tratado.

4.3 Contagem Diferencial de Glóbulos Brancos

A quantificação diferencial em valores absolutos de glóbulos brancos dos grupos não infectados e infectados, tratados e não tratados com melatonina está apresentada nas Figuras 3, 4 e 5.

Figura 3 - Quantificação diferencial de glóbulos brancos em Ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas/ml da cepa Y de *T.cruzi* e não infectados, tratados com melatonina concomitantemente ao inóculo ($p < 0,05$)

Figura 4 - Quantificação diferencial de glóbulos brancos em Ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas/ml da cepa Y de *T.cruzi* e não infectados, tratados com melatonina 07 dias antes do inóculo ($p < 0,05$).

Figura 5 - Quantificação diferencial de glóbulos brancos em Ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas/ml da cepa Y de *T.cruzi* e não infectados, sem tratamento com melatonina ($p < 0,05$)

Durante todas as fases da infecção experimental ocorreu uma linfocitose marcante nos animais pertencentes aos grupos tratados. Os animais submetidos a tratamento prévio apresentaram maior número de linfócitos. No tocante ao número de neutrófilos e monócitos, nenhum grupo apresentou resultados significativos.

4.4 - Peso Cardíaco

Pesagem dos órgãos em balança analítica (mg), os quais foram mantidos 24h em formol 10% tamponado e a seguir em álcool 70%, de onde foram retirados para pesagem após a desidratação. A figuras 6 mostra os resultados:

Figura 6 – Peso cardíaco de ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sanguícolas/ml da cepa Y de *T.cruzi* e não infectados, tratados e não tratados com melatonina. ($p > 0,05$)

Os animais submetidos ao tratamento prévio ou concomitante com melatonina apresentaram um discreto aumento no peso cardíaco.

4.5 - Peso dos Animais

Pesagem dos animais em balança semi-analítica (g). A figura 7 mostra os resultados:

Figura 7 – Peso corpóreo dos ratos Wistar machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas/ml da cepa Y de *T.cruzi* e não infectados, tratados e não tratados com melatonina. ($p > 0,05$)

O grupo infectado e não infectado tratados previamente com melatonina apresentaram um peso corporal aumentado.

4.6 Curva Mortalidade

Não houve mortalidade em nenhum grupo analisado durante os experimentos.

4.7 Análise Imunológica

4.7.1 IL- 2

Figura 8. Perfil quantitativo de IL-2 durante a evolução da doença de chagas experimental em ratos wistar machos infectados e não infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, tratados e não tratados com melatonina. ($p < 0,05$)

O tratamento prévio ou concomitante com melatonina ocasionou um aumento na produção de IL-2 tanto para os grupos infectados tratados em relação ao infectado sem tratamento.

4.7.2 IL- 12

Figura 9. Perfil quantitativo de IL-12 durante a evolução da doença de chagas experimental em ratos Wistar machos infectados e não infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, tratados e não tratados. ($p>0,05$)

Os grupos tratados com melatonina, MCMI 1 e MCMI 2, apresentaram um aumento na produção de IL-12, principalmente em relação aos grupos tratados e não infectados

4.7.3 IFN - γ

Figura 10. Perfil quantitativo de IFN- γ durante a evolução da doença de chagas experimental em ratos Wistar machos infectados e não infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, tratados e não tratados. ($p < 0,05$)

Ambos os tratamentos com melatonina provocaram um aumento na produção de IFN quando comparados com os grupos tratados e não infectados.

4.7.3 TNF - α

Figura 11. Perfil quantitativo de TNF- α durante a evolução da doença de chagas experimental em ratos wistar machos infectados e não infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, tratados e não tratados. ($p < 0,05$)

Ambos os tratamentos com melatonina provocaram um leve aumento na produção de TNF quando comparados com os grupos tratados e não infectados, porém o grupo infectado sem tratamento apresentou níveis maiores.

4.8 Análise Histopatológica

4.8.1 Grupo Não Infectado Não Tratado com Melatonina (MSMNI)

Figura 12 . Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMNI, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

4.8.2 Grupo Não Infectado Tratado com Melatonina concomitante ao inoculo (MCMNI - 1)

Figura 13 . Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMNI-1, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

4.8.3 Grupo Não Infectado Tratado com Melatonina 7 dias antes do inoculo (MCMNI - 2)

Figura 14. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMNI-2, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

4.8.4 Grupo Infectado Não Tratado com Melatonina (MSMI)

Figura 15 . Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 5º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B 400X).

Figura 15. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 9º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninhos - A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C – 100X e D – 400X)

Figura 16 . Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 12º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina(Ninhos - A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C – 100X e D – 400X)

Figura 17 . Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 15º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina(Ninhos - A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C – 100X e D – 400X)

Figura 18. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 21^o dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina(Ninhos - A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C – 100X e D – 400X)

Figura 19. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 30º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B – 400X).

Figura 20. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 45º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

Figura 21. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MSMI no 60º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

4.8.5 Grupo Infectado Tratado com Melatonina Concomitantemente ao Inóculo (MCMI -1)

Figura 22. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 5º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B 400X).

Figura 23. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 9º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninho A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C- 100X e D – 400X).

Figura 24. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 12º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninho A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C- 100X e D – 400X).

Figura 25. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 15º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninho A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C- 100X e D – 400X).

Figura 26. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 21º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (A- 100X e B - 400X).

Figura 27. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 30° dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (A- 100X e B - 400X).

Figura 28. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 45° dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (A- 100X e B - 400X).

Figura 29. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI-1 no 60º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (A- 100X e B - 400X).

4.8.6 Grupo Infectado Tratado com Melatonina 7 Dias Antes do Inóculo (MCMI -2)

Figura 30. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI – 2 no 5º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 400X e B 1000X).

Figura 31. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI- 2 no 9º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninho A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C- 100X e D – 400X).

Figura 32. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI- 2 no 12º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninho A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C- 100X e D – 400X).

Figura 33. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI- 2 no 15º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina. (Ninho A- 400X e B - 1000X e infiltrado inflamatório C- 100X e D – 400X).

Figura 34. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI – 2 no 21º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

Figura 35. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI – 2 no 30° dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

Figura 36. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI – 2 no 45° dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

Figura 37. Corte histológico do coração de ratos Wistar machos do grupo MCMI – 2 no 60º dia após infecção, corados por hematoxilina-eosina (A- 100X e B - 400X).

4.9 PARASITISMO TECIDUAL

A tabela 1 mostra os resultados qualitativos do parasitismo tecidual cardíaco dos ratos Wistar infectados com a Cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, tratados e não tratados com melatonina.

Dias de Experimento									
Grupo Experimental	Nº de animais	5º	9º	12º	15º	21º	30º	45º	60º
MSMI**	5*	-	+++	+++++	+++	++	-	-	-
MCMI – 1***	5*	-	+	+++	++	+	-	-	-
MCMI – 2****	5*	-	++	++	+	+	-	-	-

Nos grupos de animais tratados com melatonina ocorreu uma drástica redução do parasitismo tecidual com resultados mais satisfatórios com a adoção do tratamento prévio.

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou uma possível ação imunoprotetora da melatonina administrada via oral a ratos Wistar machos, sobre a doença de Chagas experimental, infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, valendo-se além dos parâmetros imunológicos, também de outros como parasitemia e pesagem cardíaca, testes estes comumente realizados em trabalhos de pesquisa sobre este tipo de parasitose.

A cepa Y de *T.cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), utilizada neste estudo, apresenta em ratos, o mesmo padrão da curva parasitêmica encontrada em roedores de menor porte, como em *Mus musculus* por exemplo, com pico compreendido entre o 12º e 14º dias, onde então, os parasitas desaparecem da circulação iniciando-se a fase crônica (ANDRADE *et al.*, 1970; ANDRADE, 1974; UYEMURA *et al.*, 1995).

A cepa Y possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoces, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA & SCORZA, 1972).

O inóculo de 150.000 formas tripomastigotas foi escolhido pelo fato do modelo experimental utilizado ser resistente a infecção por *T.cruzi*. Como o objetivo deste trabalho é analisar as possíveis ações imuno-estimuladoras da melatonina, um inóculo baixo certamente nos impossibilitaria de realizar uma avaliação mais precisa.

5.1 Parasitemia

A avaliação da parasitemia nos animais não tratados com melatonina nos mostra um pico no 9º dia após a infecção com desaparecimento das formas sangüícolas após o 21º dia. O mesmo foi observado por CAMARGOS *et al.* (2000) onde ratos infectados com a cepa Y apresentaram o mesmo perfil parasitêmico. Outros trabalhos demonstram

que o parasitismo no sangue circulante vem sofrendo alterações no decorrer de todos estes anos após sua descoberta, devido ao fato de ser mantida em roedores através de sucessivas infecções, assim assumindo novo perfil. Já os animais tratados concomitantemente com melatonina apresentaram pico de parasitemia no 12º dia pós – infecção, com valores estatisticamente reduzidos em relação ao grupo não tratado, enquanto os animais submetidos ao tratamento prévio apresentaram pico de parasitemia no 5º. dia, e com valores

O tratamento com melatonina foi extremamente efetivo na redução dos níveis de parasitas circulantes na fase aguda da infecção. Ao analisar o perfil parasitêmico, parece que o tratamento prévio foi mais efetivo em controlar o processo de redução parasitária, muito provavelmente estimulando previamente o sistema imune que pode ser observado através de um aumento das interleucinas IL-2, IL-12, TNF e IFN logo após o pico de parasitemia (5º. dia), muito provavelmente pelo fato da migração efetiva de linfócitos T para o local da infecção. O tratamento concomitante também se mostrou efetivo, reduzindo drasticamente a parasitemia também comprovado por um aumento das interleucinas anteriormente citadas.

5.2 Contagem Global de Leucócitos

Quanto a contagem global de leucócitos, a melatonina exerceu papel relevante, proporcionando um aumento significativo dos números de leucócitos para os grupos infectados e tratados como também estimulando a produção destes nos animais não

infectados submetidos ao tratamento. Este aumento está de acordo com inúmeros outros trabalhos que relatam uma ativação policlonal de linfócitos durante a fase aguda da infecção (SATO et al., 1992; GALVÃO DA SILVA & ABRAHAMSOHN, 2001).

5.3 Contagem Específica de Leucócitos

A contagem específica de leucócitos revelou um perfil linfocitário característico da doença de Chagas tanto humana como experimental. A suplementação de melatonina ocasionou durante a fase aguda um aumento do número de neutrófilos para o grupo tratado e infectado demonstrando mais uma vez a ação potencializadora da melatonina sobre a resposta imune. O mesmo aconteceu com as células mononucleares onde se observou uma linfocitose que pode ser comprovada através dos dados obtidos no perfil imunológico com aumento das interleucinas envolvidas na defesa do hospedeiro ao parasita na fase aguda da infecção.

5.4 Peso Cardíaco e Peso dos Animais

O peso cardíaco não apresentou diferenças significativas entre os grupos, demonstrando que o aumento da massa cardíaca mostrou-se diretamente proporcional ao crescimento dos animais no decorrer dos experimentos.

5.5 Histopatologia

Os dados histopatológicos confirmam a ação imuno-estimuladora da melatonina sobre a resposta imune dos animais infectados. Ambos os tratamentos foram efetivos na redução parasitária tecidual, com maior intensidade quando da utilização do tratamento prévio. Além da redução da carga parasitária tecidual, observou-se que os ninhos apresentavam menores dimensões, ausência de desorganização da arquitetura das fibras cardíacas. Fato interessante é que apesar da redução do parasitismo cardíaco ocorreu a presença de infiltrado inflamatório constante provavelmente devido a ação imunoestimuladora da melatonina sobre a resposta imune do hospedeiro. A relevância deste dado é que com a diminuição da carga parasitária cardíaca aliada a uma redução drástica dos níveis de tripomastigotas sanguíneas na fase aguda refletiu em uma fase crônica menos agressiva. Apesar de todos os grupos infectados apresentarem ausência de ninhos a partir do 30º dia após o inoculo, os animais tratados com melatonina apresentaram redução do infiltrado inflamatório refletindo uma uniformidade da arquitetura tecidual em relação ao grupo de animais infectados e não tratados.

5.6 Interleucinas

5.6.1 IFN - γ

Com relação ao papel das interleucinas na defesa do organismo, o interferon gama produzido por linfócitos T helper é uma citocina que estimula eficientemente a fusão do fagossoma com o lisossoma e a expressão do MHC classe II nos macrófagos.

Vários trabalhos relatam a importância de IFN como um fator efetivo na contenção da replicação intracelular do parasita através da indução da biosíntese de NO por macrófagos ativados (ALIBERTI et al., 1996)

O tratamento com melatonina provocou uma resposta efetiva na resposta celular do tipo TH1, onde a produção de IFN foi estatisticamente maior em relação ao grupo infectado sem adição deste hormônio. Sua ação se faz sentir mesmo nos grupos não infectados em comparação aos controles sem adição de melatonina.

Dados provando a ação estimuladora da melatonina sobre infecções com diferentes patógenos tem sido relatados como BONILLA et al., 2004 em que a terapia com este hormônio a camundongos infectados como o vírus da encefalomielite equina provocou um decréscimo da viremia, preveniu a paralisia dos membros e também evitou a morte dos mesmos.

Inúmeros trabalhos confirmam nossos dados onde relatam o papel protetor do IFN- γ no início da infecção (REED 1995) e (ROTTENBERG *et al.*, 1996) que verificaram que camundongos geneticamente deficientes do IFN- γ , eram mais susceptíveis à infecção por *T.cruzi*.

5.6.2 TNF - α

TNF estimula as células endoteliais das vênulas a expressarem o receptor de leucócito ICAM-1 que é molécula de adesão para neutrófilos e linfócitos. Essa adesão potencializa o processo de inflamação. O TNF também potencializa a síntese de prostaciclina pelo endotélio, que é uma prostaglandina vasodilatadora. Com isso ocorre uma hiperemia no local. O TNF também é capaz de estimular o endotélio a mudar a

conformação da sua membrana basal, permitindo a migração de células de primeira defesa ao local da infecção.

Nossos resultados demonstram níveis estatisticamente mais elevados de TNF em ambos os grupos de animais infectados e tratados com melatonina, sendo que o grupo que recebeu tratamento concomitante apresentou valores mais altos que os animais submetidos a tratamento prévio. Porém ao analisarmos a parasitemia verificamos que o tratamento prévio foi mais eficiente para reduzir a parasitemia. Este fato pode ser explicado em decorrência da liberação dos altos níveis de TNF que acabam se tornando prejudiciais ao organismo do hospedeiro. BONILLA et al., 2003 estudando o efeito da melatonina sobre os níveis de TNF- α e IL - 1 no cérebro camundongos infectados com o vírus da encefalite eqüina venezuelana sugere que o efeito protetor da melatonina nesta infecção viral se deve, entre outros fatores, a um decréscimo na síntese de TNF- α e conseqüente aumento de IL-1 β . Este fato pode ser observado no grupo tratado previamente com melatonina que provocou a menor parasitemia com conseqüente redução da carga tecidual cardíaca, porém com níveis menores de TNF quando comparado aos animais tratados concomitantemente e os infectados sem tratamento.

O elegante trabalho de SILVA et al., 1995, demonstrou a importância do TNF no controle da replicação parasitária. Os autores ressaltam que apesar da adição de TNF- α a camundongos C57BI/6 infectados com T.cruzi, não houve potencialização na atividade tripanosomicida do IFN- γ in vitro. Porém o tratamento desses

camundongos com anticorpos monoclonais anti-TNF-alpha, aumentavam a parasitemia e a mortalidade, concluindo que os macrófagos ativados com IFN- γ produziam altas quantidades de TNF- α após a infecção por *T. cruzi*, sugerindo que esta citocina possui um papel de relevância em amplificar a produção de NO e conseqüentemente a morte parasitária.

5.6.3 IL-2

A interleucina 2 é responsável pela expansão clonal específica de linfócitos T, formando uma população enorme de linfócitos T helpers específicos. A partir daí, os linfócitos T irão desencadear a resposta imunológica específica celular ou humoral ou ambos, dependendo do antígeno. A Interleucina 2 é uma substância autócrina, que age sobre o próprio linfócito T helper que a produziu e quando liberada também age nos linfócitos T citotóxicos. É chamada de fator de proliferação, pois estimula a mitose. Estes LTh-1 da população clonal formam IL-2 e IFN-gama que ativam os LT-citolíticos ou citotóxicos, que vão aumentar o nível da expansão clonal deles e elevar o seu metabolismo interno.

Analisando nossos resultados, podemos observar maiores níveis de IL-2, nos dois grupos tratados com melatonina em relação ao grupo infectado sem tratamento. Este fato já foi elucidado em outros estudos, como no trabalho de KIERSZENBAUM et al. (1996) que mostraram uma regulação negativa de citocinas, como IL-2, IL-4 e IL-5,

as quais normalmente são produzidas pela estimulação de linfócitos circulantes em sangue humano normal, observando uma marcante redução das mesmas em culturas contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O estudo ainda concluiu que mais de uma citocina pode ser inibida pela ação individual sobre linfócitos T ativados.

Estudos demonstram uma ação estimuladora na produção de IL-1, IL-2 IFN, IL6, e IL12. Garcia-Mauriño et al., 1997, também comprovou que a melatonina é capaz de ativar a produção de IL-2 e IFN-gama in vitro. Nossos dados são inéditos devido ao fato de que ocorreu uma estimulação significativa nos níveis de IL-2 nos animais submetidos ao tratamento com melatonina levando a uma drástica redução da carga parasitária e conseqüentemente do parasitismo tecidual.

5.6.4 IL - 12

Apesar da IL-12 ter sido originalmente identificada em sobrenadantes de culturas de células B modificadas humanas, sabe-se que é produzida primariamente por células fagocíticas como monócitos, macrófagos e neutrófilos. IL-12 é capaz de induzir células T e NK a produzirem IFN- γ , aumentar a atividade citotóxica das células NK bem como atuar como mitógeno para células T e NK. IL-12 também possui um importante papel sob os sub-grupos TH promovendo um padrão de resposta do tipo TH1 (GARCIA-MAURÍÑO et al., 1999).

A interleucina 12 é essencial para a resistência à infecção por *T. cruzi*, pois ela estimula a síntese de IFN - γ , o qual é o maior responsável pelo efeito parasiticida dos macrófagos. GALVÃO DA SILVA et al (2001) avaliou a ação endógena da IL-12 durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* com o intuito de verificar a amplificação

da proliferação de linfócitos T e células NK, e mostrou o potencial desta citocina em aumentar a linfoproliferação, sugerindo ainda, a existência de um mecanismo parcialmente independente da IL-2 endógena.

Carrillo-Vico et al. (2005) estudando as ações pleiotrópicas da melatonina em modelo de choque séptico em camundongos observou que esta era capaz de agir sinergicamente com o aumento dos níveis de TNF – alfa, IL-12 e interferon-gama no local da infecção, além de aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 localmente ou sistemicamente.

Os nossos resultados também mostraram uma ação imunoestimuladora da melatonina na produção de IL-12 principalmente para o grupo de animais tratados concomitantemente.

6- CONCLUSÃO

A administração de melatonina via oral exerceu uma ação potente imunoestimuladora que foi evidenciado por:

- Diminuição drástica do número de tripomastigotas sanguíneas na fase aguda da infecção onde o tratamento prévio exerceu melhor efetividade.
- Aumento do número de leucócitos totais, bem como dos neutrófilos e células mononucleares que participam do processo de fagocitose e produção de radicais livres nocivos ao parasita.
- Diminuição acentuada do parasitismo cardíaco com manutenção da arquitetura tecidual na fase crônica da infecção. O tratamento prévio também foi mais efetivo na redução da carga parasitária cardíaca quando comparada aos animais infectados e tratados concomitantemente.
- No tocante ao peso cardíaco, nenhum dado de relevância foi observado, permanecendo o aumento diretamente proporcional ao crescimento e peso corpóreo dos animais.
- Houve aumento dos níveis de todas as interleucinas estudadas na fase aguda da infecção, atingindo níveis mais elevados por ocasião do pico de parasitemia bem como nos dias subsequentes. À medida que os animais progrediam para a fase crônica da doença esses níveis tendem a decrescer.

- A suplementação de melatonina certamente age sobre o eixo hipófise-hipotálamo-adrenal direcionando o padrão da resposta imune a favor do hospedeiro.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAD, S.J.; ANDRADE, D.C.S.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. *Rev.Inst.Med.Trop.*, 1991. v.33, p.443-450.
2. ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen from L-arginine. **J.Imm.**, 1990. v.144, p.2725-9.
3. ALCINA, A. & FRESNO M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, 1987. Mar; v. 9, n. 2, p.175-86.
4. ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.G.; MARTINS, G.A. et al. Interleukin -12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, 1996. June, p.1961-1967.
5. ALIBERTI, J.C.S.; MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T. et al. Beta-chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, 1999. v. 67, p. 4819-4826.
6. ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano. **Rev. Patol. Trop.**, 1974. v. 3, p. 65-121.

7. ANDRADE, S.G., CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Bahia**, 1970. v. 70, p.32-42.
8. BEN-NATAHN, D., MAESTRONI, G.J.; LUSTIG S.; CONTI A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. **Arch Virol.**, 1995. v. 140, n. 2, p. 223-230.
9. BLASK, D. E. & HILL S.M. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. **J. Neural. Transm.**, 1986. v. 21, p. 433-449.
10. BONILLA, E.; VALERO, N.; CHACIN-BONILLA, L.; PONS, H.; LARREAL, Y.; MEDINA-LEENDERTZ, S.; ESPINA L.M. Melatonin increases interleukin-1 beta and decreases tumor necrosis factor alpha in the brain of mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus **Neurochem. Res.**, 2003. May, v.28, n.5, p. 681-68
11. BONILLA, E.; VALERO, N.; CHACIN-BONILLA, L.; MEDINA-LEENDERTZ, S. Melatonin and viral infections. **J. Pineal Res.**, 2004. Mar., v.21, n.2, p.73-79.
12. BORGES, M.M.; ANDRADE, S.G.; PILATTI, C.G.; PRADO JR., J.C.; KLOETZEL, J.K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1992a. v.87, p.493-502.

13. BORGES, M.M.; MELLO, D.A.; TEIXEIRA, M.L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. **Rev.Saúde Pública**, 1982. v.16,p.233-42.
14. BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Parasitol.**, 1965. v.59, p.19-26.
15. BRENER, Z. & CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo**, 1963. v.5, p:220-224.
16. BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst Med Trop São Paulo**, 1962. v. 4, p. 389-396.
17. . BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. ed. 2, Editora Guanabara Koogan, RJ, 2000. p. 55-6.
18. BRITO, M.M.; PIRES, M.Q.; PACHECO, R.S. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastide Biology and Disease**, 2003. v.2, p.1-7.
19. BRUMPT, E. *Schizotrypanum cruzi* - diferentes phases de son cycle évolutif. **Bull.Soc.Pathol.Exot.**, 1912. v.5, p.261-2.
20. CAMARGOS, E.R.S.; FRANCO, D.J.; GARCIA, C.M.M.G.; DUTRA, A.P.; TEIXEIRA JUNIOR, A.L.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R.S. Infection with different

Trypanosoma cruzi populations in rats, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 2000. v. 62, p.604-612.

21. CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infection and Immunity**, 1996. v. 64, p.128-34.

22. CARDINALI, D. P. & ROSNER, J.M. Retinal localization of HIOMT in the rat. **Endocrinology**, 1971. v. 89, p. 301-307.

23. CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P.J.; NAJI, L.; FERNANDEZ-SANTOS, J.M.; MARTIN-LACAVE, I.; GUERRERO, J.M.; CALVO, J.R. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. **J. Pineal Res.**, 2005. Nov., v.39, n.4, p.400-408.

24. CASTRO, M.A.P & BRENER, Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 1985. v. 18, p. 233-239.

25. CAVALLO, A. Plasma melatonin rhythm in disorders of puberty: interactions of age and puberal stages. **Neuroendocrinology**, 1992. v. 55, p. 372-379.

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

27. COHEN, M.; ROSELLE, D.; CHABNER, B.; SCHMIDT, T.J.; LIPPMAN, M. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. **Nature**, 1978. v. 274, p. 894-899.
28. COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, 2002. v.97, p.3-24.
29. CUTANDO, A. & SILVESTRE, F.J. Melatonin: implications at the oral level. **Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol**, 1995. Sep-Oct; v. 8(3-4), p. 81-86.
30. DELAGRANGE, P.; ATKINSON, J.; BOUTIN, J. A. et al. Therapeutic Perspectives for Melatonin Agonists and Antagonists. **J Neuroendocrinology**, 2003. v. 15, p.442-448.
31. DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: Brener, Z.; Andrade, Z.A. eds. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.
32. DOST, C.K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W. PRADO JR, J.C. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol. Research.**, 2002 DOI 10.1007/s00436-001-0553-8.
33. DRAZEN, D.L.; KLEIN, S.L.; YELLON, S.M.; NELSON, R.J. In vitro melatonin treatment enhances splenocyte proliferation in prairie voles. **Journal of Pineal Research**, 2000. Jan., v. 28, n.1, p. 34-40.

34. DUBOCOVICH, M.L. & TAKAHASHI, J.S. Use of 2-[¹²⁵ I] iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 1987. v. 84, p. 3916-3922.
35. DUBOCOVICH, M.L. Characterization of a retinal melatonin receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 1985. v. 234, p. 395-399.
36. EL-SOKKARY, G.H.; REITER, R.J.; ABDEL-GHAFFAR, S. K.H. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thimic lymphocytes of old rats. **Neuro Endocrinol. Lett.**, 2003. Jun-Aug, v. 24 (3-4), p. 215-223.
37. EVANS, T.G.; REED, S.S.; HIBBIS, J.R. Nitric Oxide production in murine *Leishmaniasis*: correlation of progressive infection with increase in systemic synthesis of Nitric Oxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 1996. v.54, p.486-489.
38. GALVÃO DA SILVA, A.P.; JACYSYN, J.F.; ABRAHAMSOHN, I.A. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology** , 2003. v. 108, p. 230-237.
39. GALVÃO DA SILVA & ABRAHAMSOHN, I.A. Interleukin-12 stimulation of linfoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology** , 2001. v. 104, p. 349-354.
40. GARCIA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M.G.; CALVO J.R.; RAFIHEL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J.M.

Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.**, 1997. Jul., v. 159, n. 2, p. 574-581.

41. GARCIA-MAURINO, S.; POZO, D.; CARRILO-VICO A. et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.*, 1999.v. 65, n.20, p.2143-50

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

43. HOARE, C.A. The Trypanosomes of mammals. Oxford, **Blackwell Sci.**, 1972. p.749.

44. JAMES, S.L. Role of Nitric Oxide in parasitic infections. **Microb.Rev.**, 1995. v.59, p.533-547.

45. JIMERSON, D.C.; LYNCH, H.J.; POST, R.M.; WURTMAN, R.J.; BUNNEY Jr., W.E. Urinary melatonin rhythms during sleep deprivation in depressed patients and normals. **Life Sci.**, 1977. v. 20, p. 1501-1505.

46. KANG J.; AHN M.; KIM Y. et al. Melatonin ameliorates autoimmune encephalomyelitis through suppression of intercellular adhesion molecule-1. **J.Vet. Sci.**, 2001. v. 2, n. 2, p. 85-89.

47. KAPPERS, J.A.; SMITH, A.R.; VRIES, R.A.C. The mammalian pineal gland and its control of hypothalamic activity. In: SWAAB, D.F.; SCHADE, J.P. (Eds.). **Progress in brain research**. Amsterdam: Elsevier, 1974. v. 41, p. 149-174.

48. KIERSZENBAUM, F & HOWARD, J.D. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection; the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol**, 1976. v. 116, p.755-766.

49. KIERSZENBAUM, F.; LOPEZ, H.M.; SZTEIN, M.B. *Trypanosoma cruzi* downregulates the production of interleukin-2, interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-5 by activated human lymphocytes. **J. Parasitol.**, 1996. Aug, v. 82, n. 4, p. 652-656.

50. KIRCHHOF, L.V. **Trypanosoma species (American trypanosomiasis, Chagas Disease): Biology of trypanosomes. Principles and practice of infectious diseases**. Churchill Livingstone, New York, 1995. 4 ed. Cap. 242, p. 2442-2450.

51. KLEIN, D.C. The pineal gland: a model of neuroendocrine regulation. In: REICHLIN, S.; BALDESSARINI, R.J.; MARTIN, J.B. (Eds.). **The hypothalamus**. New York: Raven Press, 1978. v. 56, p. 303-327.

52. KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis: **Adv.Parasitol.**, 1968. v.6, p.63-116.
53. KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, 1976. v.116, p.755-60.
54. KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol**, 1982. v. 128, p. 2009-2012.
55. LAGUENS, R.P.; MECKERT, P.M.C.; VIGILIANO, C.V. Patogenia de la miocarditis chagásica crónica humana. **Medicina (Buenos Aires)**, 1999. v.59, p.63-68.
56. LENER, A.B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. **J Am Chem Soc.**, 1958. v.80, p.2587.
57. LEWY, A.; WEHR, T., GOODWIN, F.; NEWSOME, D.; MARKLEY, S. Light suppresses melatonin secretion in humans. **Science**, 1980. v. 210, p. 1267-1272.
58. LEWY, A.J. Biochemistry and regulation of mammalian melatonin production. In: RELKIN, R. (Ed.). **The pineal gland**. New York: Elsevier Biomedical, 1983. p. 77-128.
59. LIEW, F.Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M.V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with induction of Nitric Oxide synthase in murine macrophages. **Eur.J.Imm.**, 1991. v.21, p.3009-3014.

60. LOPES, E.R. Resposta inflamatória na fase crônica da forma adquirida da Doença de Chagas. **Rev.Patol.Trop.**, 2002. v.31, p.23-59.
61. LOPEZ-GONZALEZ, M. A.; CALVO, J.R.; RUBIO, A.; GOBERNA, R.; GERRERO, J.M. Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rat. **Life Sci.**, 1991. v. 48, p. 1165-1173.
62. MACKANESS, G.B. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. **J. Exp. Med.**, 1969. v. 129, p. 973-992.
63. MAESTRONI, G. S.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W. Pineal melatonin: its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. **Ann. New York Acad. Sci.**, 1988. v. 521, p. 140-148.
64. MAESTRONI, G.J. The immunotherapeutic potencial of melatonin. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 2001. Mar; v.10 (3), p.467-476.
65. MARTINS, E. J.; 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 tumor-bearing rats. **J. Neuroimmunol.**, 1998. Feb., v.82 (1), p. 81-89.
66. MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J.Parasitol.**, 1978. v.64 (3), p.475-82.

67. MILLER, G. E.; COHEN, S. & RITCHEY, A K. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. **Health Psychol.**, 2002. Nov; v.21 (6), p.531-41.
68. MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology of Nitric Oxide. **Pharmac.Rev.**, 1991. v.43, p.109-242.
69. MOORE, R. Y. Mecanismos neuroendócrinos – células e sistemas. In: YEN, S.C.C.; JAFFE, R.B. (Eds.). **Endocrinologia Reprodutiva**, 1990. Editora Rocca, p. 19-20.
70. MORREY, M.K.; MCLACHLAN, J.A.; SERKIN, C.D.; BAKOUCHE, O. Activation of human monocytes by the pineal neurohormone melatonin. *J. Immunol.*, 1994. v.153, p. 2671-2680.
71. MURRAY H.W.; SPITATALNY, G.L. & NATHAN, C.T. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. **J Immunol.**, 1985. Mar; v.134 (3), p.1619-22.
72. NATHAN, C.; NOGUEIRA, N., JUANGBHANICH, C., ELLIS, J. & COHN Z. Activation of macrophages in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, 1979. v.149, p.1056-1068.
73. NILES, L.P. High-affinity binding sites for melatonin in hamster spleen. **Med. Sci. Res.**, 1989. v. 17, p. 179-183.

74. NUNNARI, G.; NIGRO, L.; PALERMO, F.; LETO, D.; POMERANTZ, R.J.; CACOPARDO, B. Reduction of serummelatonin levels in HIV-1-infected individual's parallel disease progression: correlation with serum interleukin – 12 levels. *Infection*, 2003. v. 31, p. 379-382.

75. OLIVEIRA, J.S.M. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. **Am.Heart.J.**, 1995. v.110, p.1092-1098.

76. OLIVEIRA, M.A.; SANTIAGO, H.C.; LISBOA, C.R. et al. *Leishmania sp*: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. **Exp. Parasitol.**, 2000. v. 95, p.96-105.

77. OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a co stimulatory factor for interferon- γ -induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 1992. USA. v. 89, p. 8676-8680.

78. PANG, S.F.; YUAN, H.; YU, Z.H.; WANG, X.L.; TANG, P.L.; YAU, M.Y.C.; LEE, P.P.N. Melatonin binding sites in the nervous and immune systems. In: FRANSCHINI, F. & REITER, R.J. (Eds.). **Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation**. Plenum Press, New York, 1991. p.107.

79. PERLOW, M.J.; REPPERT, S.M.; TAMARKIN, L.; WYATT, R. J.; KLEIN, D.C. Photic regulation of the melatonin rhythm: monkey and man are not the same. **Brain Res.**, 1980. v. 182, p. 211-219.

80. PERSENGIEV, S.; USHEVA, A.; KANCHEV, L. Biochemical characteristics of melatonin receptors in different organs and translation of hormonal signal in the nucleus. In: FRANSCHINI, F. & REITER, R.J. (Eds.). **Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation**. Plenum Press, New York, 1991. p.137.

81. PLATA, F.; GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Ann Inst Pasteur Immunol.**, 1987. May-Jun; v.138 (3) p.397-415.

82. PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; GARCIA-PONS, F. et al. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Eur. J. Immunol.**, 1984. v. 14, p. 903-905.

83. PRADO, J.C.J.; LEVY, A.M.A.; LEAL, M.P.; BERNARD, E. & KLOETZEL, J.K. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol.Research.**, 1999. v.85, p.826-29.

84. PRADO, JR, J.C.; LEAL, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A. et al. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Callomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res.**, 1998. v. 84, p. 100-105.

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

86. REICHLIN, S. The pineal gland. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W. (Eds.). **Williams textbook of endocrinology**. 8th. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 240-253.
87. REITER, R. J. & ROBINSON, J. Melatonina. Rio de Janeiro: Record, 1996.
88. REITER, R. J.; MELCHIORRI, D.; SEWERIJNECK, E.; POEGGLER, B.; BARLOW-WALDER, L.R.; CHUANG J.I.; ORTIZ, G.G.; ACCUNÃ-CASTROVIEJO, D. A review of the evidence supporting melatonin's role as na anti-oxidant. **J. Pineal Res.**, 1995. v. 18, p. 1-11.
89. REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. **Endocr. Rev.**, 1991. v. 12, p.151-180.
90. REYES, C. La Glándula Pineal Y Órganos Circunventriculares. In: TREVIÑO, A. Z., et al. **Fundamentos de neuroendocrinología**. 1 ed. México, 1993. Cap. IV, p. 53-72.
91. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; RASSI, A.; KÖBERLE, F. Chaga's disease. In: Schonfeld, H. (Ed.), **Antiparasitic Chemoterapy**. S. Karger, Basel, 1991. p. 115-134.
92. ROSENGARTEN, H.; MILLER, E.; FRIEDHOFF, A. J. In vitro enzymatic formation of melatonin human erythrocytes. **Res. Commum Chem. Pathol. Pharmacol.**, 1972. v. 4, p. 457-461.

93. ROSSI, M.A., BESTETTI, R.B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. **Cardiology.**, 1995. v.86, p.1-7.
94. ROTTENBERG, M.E.; CASTANOS-VELES, E.; DE MESQUITA, R.; LAGUARDIA, O.G.; BIBERFIELD, P.; ORN, ^a Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **Eur. J. Immunol**, 1996. v. 26, p.3203-3213.
95. SATO, M.N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; TANJI, M.M.; KANENO, R.; HIGUSHO, M.L.; DUARTE, A.J. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Infect Immun.**, 1992. v. 60(3)Mar. p. 1024-1030.
96. SCORZA, C. & SCORZA, J.V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty- ninth day after inoculation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 1972. v. 14, p.171-177.
97. SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, 1995. Dec., v. 63, n. 12, p. 4862-4867.
98. SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folha Clínica Biol. São Paulo**, 1953. v. 20, p.191-201.

99. SKWARLO, S. K. Functional connections between the pineal gland and immune system. **Acta Neurobiol Exp. (Wars)**, 1996. v. 56 (1), p. 341-357.
100. SKWARLO, S.K. Melatonin in immunity: comparative aspects. **Neuroendocrinol Lett.**, 2002. Apr; v. 23, Suppl 1, p. 61-66.
101. SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L.; CURI, P.R. Acritical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 1993. Sep –Oct, v. 35(5), p. 395-398.
102. TALIAFERRO, W. & PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, 1955. v. 96, p. 199-226.
103. TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; HARDELAND, R. et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **J. Pineal Res.**, 2003. v. 34, p.75-78.
104. TARLETON, R.L. Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 1988. v. 73, p.186-190.
105. THOMSON, L.; GADILLHA, F.R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A.E.; RADI, R. Peroxynitrite affects Ca²⁺ transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, 1999. v. 98, p.81-941.

106. TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv. Immunol.**, 1998. v.70, p. 83-243.
107. TRISCHMANN, T. M. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **P. Immunol.**, 1984. v.6, p. 561-570.
108. UYEMURA, S.A.; ALBUQUERQUE, S.; CURTI, C. Energetics of Heart Mitochondria during Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection in Rats. **Inst. J. Biochem. Cell Biol.**, 1995. v.27 (11), p.1183-9.
109. WEBLEY, G.E. & LEIDENBERGER, F. The circadian pattern of melatonin and its positive relationship with progesterone in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 1986. v. 63, p. 323-330.
110. WEINBERG, U.; D' ELETTO, R.D.; WEITZMAN, E.D.; ERLICH, S.; HOLLAMDER, C.S. Circulating melatonin in man: episodic secretion through-out the light-dark cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 1979. v. 48, p. 114-120.
111. WETTERBURG, L.; ARENDT, J.; PAUNIER, L.; SIGONENKO, P.C.; VANDONSELAAR, W.; HEYDEN, T. Human serum melatonin changes during the menstrual cycles. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 1976. v. 42, p. 185-188.
112. WHO 2003. Control of Chagas Disease. Report of WHO Expert Committee, WHO Technical Report Series n 811, Geneva, 95 pp.

113. WITT-ENDERBY, P.A.; BENETT, J.; JARZYNSKA, M.J. et al. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. **Life Sciences**, 2003. v.72, p. 2183-2198.
114. YU, Z.H.; YUAN, H.; LU, L.; PANG, S.F. A [¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. **Neurosci. Lett.**, 1991. v.125, p. 175-183.
115. ZHADONOVA, I. V.; WURTMAN, R. J.; SCHOMER, D. L. Sleep – inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. **Clin. Pharmacol. Therap.**, 1995. v. 57, p. 552-558.