

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Centro de Biociências e Biotecnologia
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

Nayara Inocencio Machado

Melatonina reduz o desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em
células LLC-MK2

Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

Nayara Inocencio Machado

Melatonina reduz o desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em
células LLC-MK2

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia

Coorientador: Renato Augusto DaMatta

Orientador: Sergio Henrique Seabra

Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil

Março de 2020

MELATONINA REDUZ O DESENVOLVIMENTO DE *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS LLC-MK2

NAYARA INOCENCIO MACHADO

Tese apresentada ao Centro de Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Examinada em 24 de março de 2020

Prof^a. Dr^a. Jessica Many Dias Bittencourt Vieira

Prof. Dr. Jorge Hernandez Fernandez

Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Coorientador)

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Orientador)

Epígrafe

“Onde quer que haja mulheres e homens, há sempre o que fazer, há sempre o que ensinar, há sempre o que aprender.”

Paulo Freire

Agradecimentos

Creio que essa seja a parte mais difícil de toda essa escrita. Tarefa difícil já que resumir e agradecer a tudo e todos que fizeram parte desses anos é difícil e quase incalculável.

Agradeço a Ele, sempre, por toda a força, todas as noites em que Foi minha companhia e não me deixou desistir.

Aos meus pais, Rosângela e Edson, por serem os melhores desse mundo em termos de amor, compreensão e não-desistência. Por terem enxugado minhas lágrimas, me abraçado e aconchegado nos piores dias com aquele certo “vai dar tudo certo” no pé no ouvido. E não é que deu mesmo? Devo a vocês minha vida, meu amor, meu carinho.

Ao meu irmão, Bruno, por ter sido meu exemplo de perseverança, de sonho. A ele que esteve no papel de irmão/melhor amigo a minha vida toda. Sem tirar nem pôr. Te agradeço, irmão! Sua irmã aqui chegou lá por você ter dito tudo que ela precisava ouvir.

A minha cunhada, Carla, por estar sempre com ouvidos atentos a tudo que eu digo, pela disposição em sempre me ajudar, sejam quais forem os assuntos. Nunca mediu esforços nessa busca sagaz em me fazer ver a vida como uma coisa boa, leve. Te dedico grande parte dessa conquista.

Aos meus avós, Wilma e Nestor, por todo o amor e carinho. Por todo o suporte emocional, obrigada! Amo vocês com todo meu coração!

Aos meus avós, Humberto (*in memoriam*) e Iedda (*in memoriam*), por terem existido na minha vida. Eu só tenho a agradecer a Deus por ter colocado vocês dois na minha vida. A saudade bate todos os dias, mas sei que não estou só. Obrigada! Amo vocês onde estiverem.

Aos meus amigos de laboratório, de boa parte dos meus dias, Aline Lorete, Pedro Rodrigues, Thamyres Vianna, Gabrielle Laut, Pedro Theófilo, Felipe Moreira. Obrigada por tornarem esse processo mais leve, mais alegre e possível de se tornar real. A cada um de vocês eu dedico parte deste trabalho. A cada um de vocês o meu muito obrigada!

Aos amigos da UENF, Tâmara Ribeiro, Natália Almeida, Thiago Torres. Obrigada pela receptividade alegre de sempre, de todos os almoços rodeados em risadas e boas histórias e por toda a ajuda em horas que eu não podia estar

presente. Obrigada por todo o aporte quando estive distante e até mesmo durante minha presença. A ajuda de cada um de vocês foi fundamental.

Ao meu professor, orientador, Sergio Seabra, por todos esses 8 anos de trabalho em conjunto. Sim... foram 8 anos! Obrigada por me ensinar tudo que sei durante esses anos e por ter acreditado em mim, na minha responsabilidade e competência.

Ao meu professor, coorientador e responsável por grande parte deste bem sucedido trabalho, Renato DaMatta, o “chefe”. Chefe, obrigada! Obrigada por me aguentar com tantos e-mails, ligações e dúvidas. Por me dar tantas ideias produtivas e me ensinar tanto! Obrigada por também não ter desistido de mim e ter ido comigo até o fim dessa etapa.

Agradeço também aos financiadores dessa pesquisa, CAPES, CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro que gerou e foi responsável por todo este trabalho. A FAPERJ, agradeço imensamente pela bolsa auxílio a mim concedida durante esses 4 anos.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Toxoplasmose.....	3
2.1.2. Toxoplasmose congênita.....	5
2.1.3. Toxoplasmose ocular.....	6
2.1.4. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos.....	6
2.1.5. Epidemiologia da toxoplasmose.....	7
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i>.....	8
2.2.1. Ciclo de vida.....	8
2.2.2. Ciclo de vida intracelular.....	10
2.2.2.1. Ciclo lítico.....	10
2.3. Ultraestrutura de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	11
2.3.1. Taquizoítos.....	12
2.3.2. Bradizoítos e cistos teciduais.....	13
2.4. Tratamento para toxoplasmose.....	15
2.4.1. Sulfadiazina.....	16
2.4.2. Pirimetamina.....	17
2.4.3. Espiramicina.....	18
2.4.4. Clindamicina.....	19
2.4.5. Efeitos colaterais e mecanismos de resistência.....	20
2.5. Melatonina.....	21
2.5.1. A glândula pineal.....	21
2.5.2. O ciclo circadiano.....	22
2.5.3. Biossíntese de melatonina.....	22
2.5.4. Melatonina e seu papel na imunidade.....	23
2.6. Quimioterapia com melatonina.....	24
2.6.1. Tripanossomíase e melatonina.....	24

2.6.2. Malária e melatonina.....	26
2.6.3. Leishmaniose e melatonina.....	27
2.6.4. Amebíase e melatonina.....	27
2.6.5. <i>Toxoplasma gondii</i> e melatonina.....	28
2.7. Mecanismos de morte celular.....	29
2.7.1. Apoptose.....	29
2.7.2. Necrose.....	30
2.7.3. Autofagia.....	31
3. Objetivos.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. Manuscrito.....	34
4.1. Treatment with melatonin induces a reduction of <i>Toxoplasma gondii</i> development in LLC-MK2 cells	
5. Discussão.....	54
6. Conclusão.....	57
7. Referências.....	58

Lista de abreviaturas e siglas

- 5-HT: 5-hidroxitriptamina
- μm : Micrômetros
- AAD: Descarboxilase de ácidos aromáticos
- AA-NAT: alrilalquilamina N-acetiltransferase
- DHFR: Di-hidrofolato redutase
- DHPS: Di-hidropteroato sintase
- DMEM: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- FBS: Soro fetal bovino
- IFN: Interferon
- iNOS: Óxido nítrico sintase-induzível
- mM: Milimolar
- NAS: N-acetilserotonina
- NO: Óxido nítrico
- PBS: Solução tamponada de fosfato
- PHEM: Pipes, Hepes, EGTA, Magnésio
- RNA: Ácido ribonucleico
- TPOH: 5-hidroxitriptofano

Lista de figuras

Figura 1 - Vias de contaminação pelo <i>Toxoplasma gondii</i> (Traduzido de Robert-Gangneux & Dardéc, 2012).	4
Figura 2 - Distribuição geográfica da prevalência de anticorpos para <i>Toxoplasma gondii</i> pelo mundo (Traduzido de Hill & Dubey, 2014).	8
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> (Traduzido de Sibley <i>et al.</i> , 2009).	10
Figura 4 – Representação do ciclo lítico de <i>Toxoplasma gondii</i> (Traduzido de Blader <i>et al.</i> , 2015).	11
Figura 5 – Esquema da ultraestrutura da forma taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> (Traduzido de Dubey <i>et al.</i> , 1998).	12
Figura 6 – Processo de divisão por endodiogenia de <i>Toxoplasma gondii</i> (Nishi <i>et al.</i> , 2008).	13
Figura 7 – Esquema da ultraestrutura de bradizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> (Traduzido de Dubey <i>et al.</i> , 1998).	15
Figura 8 – Estrutura química da Sulfadiazina (Retirado de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadiazine . Acessado em 23/02/2020).	17
Figura 9 – Estrutura química da Pirimetamina (Retirado de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrimethamine . Acessado em 23/02/2020).	18
Figura 10 – Estrutura química da Espiramicina (Retirado de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spiramycin#section=2D-Structure . Acessado em 23/02/2020).	19
Figura 11 – Estrutura química da Clindamicina (Retirado de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clindamycin#section=2D-Structure . Acessado em 23/02/2020).	20
Figura 12 – Biossíntese da melatonina (Adaptado de Bagnaresi <i>et al.</i> , 2012).	23

Figura 13 – Interações entre os sistemas imune e neuroendócrino através de sinalização específica desencadeada por estímulos externos e internos (Adaptado de Calvo <i>et al.</i> , 2013).	24
Figura 14 – Ilustração das etapas que estão envolvidas no processo de morte celular programada (apoptose) (Traduzido de Kerr <i>et al.</i> , 1972).	30
Figura 15 – Diagrama ilustrativo com as diferenças entre necrose e apoptose (Traduzido de Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).	31
Figura 16 – Esquema representando os três principais tipos de morte celular: apoptose, necrose e autofagia (Traduzido de Henriquez <i>et al.</i> , 2008).	32
Figura 1 manuscrito - Cell viability of LLC-MK2 cells after melatonin treatment. Cells were cultured and treated with 0.75, 1.5, and 3mM of melatonin for 24 or 48 h or six days. After treatment cell viability was measured by the 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide salt (MTT) assay.	43
Figura 2 manuscrito - Cell viability of LLC-MK2 cells after melatonin treatment. Cells were cultured and treated with 0.75, 1.5, and 3mM of melatonin for 24 or 48 h or six days. After treatment cell viability was measured by the 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide salt (MTT) assay.	44
Figura 3 manuscrito - Bright-field light microscopy images of LLC-MK2 cells infected with <i>Toxoplasma gondii</i> . Cells were treated with melatonin (3mM) or left untreated, or melatonin was withdrawn, and cells further cultured for 96 h. Cells without melatonin treatment (<i>Control</i>), after 24 h (a), 48 h (b), and six days (c) of infection. Cells treated with melatonin (<i>Treated</i>) after 24 h (d), 48 h (e) and six days (f) of infection. Cells treated with melatonin for 24 h (g), 48 h (h) and six days (i) of infection, washed, and cultured without melatonin (<i>Withdrawal</i>) for an extra 96 h.	45

<p>Note the absence of rosettes in the 24 h melatonin withdrawn (g). Bar = 20 μm</p>	
<p>Figura 4 manuscrito - Scanning electron microscopy images of <i>Toxoplasma gondii</i>-infected LLC-MK2 cells with or without melatonin (3mM). Host cells after 48 h (a) and six days (b) of <i>T. gondii</i> infection without melatonin treatment (<i>Control</i>). Host cells infected by <i>T. gondii</i> after 48 h (c) and six days (d) of melatonin treatment (<i>Treated</i>).</p>	46
<p>Figura 5 manuscrito - Transmission electron microscopy images of <i>Toxoplasma gondii</i> infected LLC-MK2 cells, with or without melatonin (3mM). Intracellular parasites in host cell without melatonin (<i>Control</i>) after 24 h (a). After 24 h of treatment (<i>Treated</i>), parasite presented vacuoles (<i>arrowhead</i>), and myelin-like structures were seen in the parasitophorous vacuole (<i>arrows</i>) (d). Intracellular parasites without treatment (<i>Control</i>) after 48 h (b). Intracellular structures similar to degraded parasites after 48 h of treatment (<i>Treated</i>) (e). Parasites without treatment (<i>Control</i>) after six days (c). Parasites presented vacuoles (<i>arrowhead</i>), ruptured parasite (<i>large arrow</i>) and myelin-like structures (<i>arrow</i>) after six days of treatment (<i>Treated</i>) (f).</p>	47
<p>Figura 6 manuscrito - Differential interference contrast (DIC) and fluorescence images after the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay of <i>Toxoplasma gondii</i>-infected LLC-MK2 cells treated with melatonin (3mM). DIC of cells infected with <i>T. gondii</i> (a). Fluorescence image of parasites positively labeled for DNA fragmentation (<i>arrows</i>) (b). DIC and TUNEL merge images (c). Bar = 5μm</p>	48

Resumo

Toxoplasma gondii é parasito intracelular obrigatório capaz de infectar vertebrados de sangue quente incluindo o homem, com aproximadamente um terço da população mundial apresentando soropositividade para *T. gondii*. O tratamento atualmente utilizado não é capaz de eliminar por completo o parasito do organismo hospedeiro, o que torna essencial o desenvolvimento de novas terapias. Melatonina é hormônio capaz de regular o ciclo circadiano em vertebrados. Ademais, foi descrito que a melatonina é capaz de reduzir danos em casos de infecção por *Trypanosoma (T.) cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *T. gondii*. No entanto, estudos com *T. gondii* só foram realizados *in vivo*. Nossos estudos dão início a análises *in vitro* do efeito da melatonina no *T. gondii* durante infecção de células LLC-MK2. Análises por microscopia óptica demonstraram que o tratamento com melatonina reduziu a carga parasitária na célula hospedeira, com redução de 90% do índice de infecção após 6 dias de tratamento. Além disso, a suspensão do tratamento demonstrou que a proliferação do parasito se mantém controlada. Análise de viabilidade celular por ensaio de MTT demonstrou que a melatonina apresenta baixa toxicidade para a célula hospedeira, pois pouco afetou seu crescimento durante o tratamento. Análises por microscopia eletrônica de varredura indicaram que os parasitos que se mantiveram nas células apresentaram alterações morfológicas e não houve formação de cistos teciduais. Por microscopia eletrônica de transmissão visualizou-se alterações ultraestruturais no parasito, com a formação de vacúolos em seu interior e possíveis figuras de mielina que podem ter relação com morte celular por apoptose. Outros parasitos tiveram sua membrana rompida, ocorrendo o extravasamento do seu citoplasma, indicando possível morte por necrose. O cálculo da concentração inibitória mínima (IC₅₀) para *T. gondii* após o tratamento com melatonina foi 3mM após 24 h de tratamento, 1.69mM após 48 h e 1.13mM após 6 dias. Estes dados sugerem que a melatonina é capaz de reduzir a carga parasitária sem afetar de forma crucial a viabilidade da célula hospedeira, sendo um composto que pode se tornar candidato a terapia anti-*Toxoplasma*.

Palavras-chave: Melatonina, Quimioterapia, *Toxoplasma gondii*

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite capable of infecting warm-blooded vertebrates including man, with approximately one third of the world population showing seropositivity for *T. gondii*. The currently treatment used is not able to eliminate the parasite of the host organism, thus the development of new therapies against *T. gondii* is essential. Melatonin is a hormone capable of regulating the circadian cycle in vertebrates. In addition, it has been reported that melatonin is able to reduce damage in cases of infection by *Trypanosoma cruzi* (T.), *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. and *T. gondii*. However, studies with *T. gondii* have only been carried out *in vivo*. Our studies initiate *in vitro* analyzes of the effect of melatonin on *T. gondii* during infection of LLC-MK2 cells. Analysis by optical microscopy showed that treatment with melatonin reduced the parasitic load on the host cell, with a 90% reduction in the infection rate after 6 days of treatment. In addition, the suspension of treatment demonstrated that the parasite proliferation remains controlled. Cell viability analysis by MTT assay showed that melatonin has low toxicity to the host cell, as it has little effect on its growth during treatment. Analysis by scanning electron microscopy indicated that the parasites that remained in the cells showed morphological changes and there was no formation of tissue cysts. Transmission electron microscopy showed ultrastructural changes in the parasite, with the formation of vacuoles inside and possible myelin figures that may be related to cell death due to apoptosis. Other parasites had their membranes ruptured, causing their cytoplasm to leak, indicating possible death by necrosis. The calculation of the minimum inhibitory concentration (IC₅₀) for *T. gondii* after treatment with melatonin was 3 mM after 24 h of treatment, 1.69 mM after 48 h and 1.13 mM after 6 days. These data suggest that melatonin is able to reduce the parasitic load without crucially affecting the viability of the host cell, being a compound that can become a candidate for anti-*toxoplasma* therapy.

Keywords: Chemotherapy, Melatonin, *Toxoplasma gondii*

1. Introdução

Estima-se que um terço da população mundial esteja acometida pela toxoplasmose (Mammari *et al.*, 2019), porém, a infecção é assintomática e não afeta a qualidade de vida dos portadores na maioria dos casos, mas pode causar sintomas graves em pacientes com imunidade comprometida (Alday & Dogget, 2017). *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, é parasito intracelular obrigatório que possui como hospedeiros definitivos os felinos, onde é capaz de se reproduzir sexuadamente, e como hospedeiros intermediários os seres humanos e outros animais de sangue quente (Lourido, 2019). O atual tratamento de primeira linha para a doença ocorre através da utilização de fármacos antifolato como a sulfadiazina e pirimetamina (Alday & Dogget, 2017; Dunay *et al.*, 2018). Para gestantes, que são gravemente acometidas pela infecção, o tratamento é feito com espiramicina, sendo este fármaco atóxico e incapaz de atravessar a placenta (Garin & Eyles, 1958; Niel & Videau, 1981; Liu *et al.*, 2015).

Melatonina é neurohormônio produzido majoritariamente pela glândula pineal e tem como função principal a regulação do sono em mamíferos através do ciclo circadiano (Ostrin, 2018). Este hormônio pode ser produzido em menor quantidade pela retina (Cardinali & Rosner, 1971; Tosini & Menaker, 1998), pele (Slominski *et al.*, 2005), medula óssea (Conti *et al.*, 2000) e trato gastrointestinal (Raikhlin & Kvetnoy, 1976; Bubenik, 2002).

No entanto, a melatonina tem sido descrita como quimioterápico e antimicrobiano, sendo capaz de modular a infecção causada por parasitos como *Leishmania* spp. (Elmahallawy *et al.*, 2014; Laranjeira-Silva *et al.*, 2015), *T. cruzi* (Oliveira *et al.*, 2013), *Plasmodium (P.) yoelii* (Guha *et al.*, 2007), *Entamoeba (E.) histolytica* (França-Botelho *et al.*, 2011) e *T. gondii* (Baltaci *et al.*, 2003, 2004, 2005). Em casos de infecção por *Leishmania (L.) infantum* a melatonina reduziu o número de parasitos através da alteração de parâmetros mitocondriais, como os níveis de Ca^{2+} (Elmahallawy *et al.*, 2014). Na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* realizada na fase escura do ciclo circadiano (Laranjeira-Silva *et al.*, 2015) houve diminuição das lesões em camundongos, indicando sua relação direta com a infecção, além de reduzir o número de parasitos *in vitro* após o tratamento com melatonina. Durante infecção por *T. cruzi*, Oliveira e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento com melatonina pode

reduzir a inflamação durante a cardiomiopatia ocasionada pela infecção. Em 2007, Guha e colaboradores demonstraram que a melatonina possui atividade antioxidante, reduzindo a apoptose de hepatócitos do fígado de camundongos durante infecção por *P. yoelii*. Para *E. histolytica* a melatonina demonstrou função semelhante ao *P. yoelii*, reduzindo as lesões hepáticas em ratos, bem como o número de parasitos durante a infecção (França-Botelho *et al.*, 2011). Em casos de infecção pelo *T. gondii*, a suplementação com melatonina aumentou os níveis de zinco no plasma sanguíneo de ratos, assim como a produção de células imunes (Baltaci *et al.*, 2003, 2005) e a regulação da produção de óxido nítrico (NO) (Baltaci *et al.*, 2004).

Baseado nessas informações, o objetivo deste estudo foi analisar o tratamento *in vitro* com melatonina de células infectadas pelo *T. gondii*. Para tais análises, foram feitas interações *in vitro* entre células epiteliais LLC-MK2 e taquizoítos de *T. gondii* que posteriormente foram tratadas com melatonina. A melatonina reduziu o crescimento de *T. gondii* nas células LLC-MK2, sugerindo que pode se tornar candidata a terapia anti-*Toxoplasma*, agindo em sinergismo com outros fármacos já existentes ou no auxílio da produção de novos quimioterápicos com ampla abrangência terapêutica.

2. Revisão de Literatura

2.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é doença de grande significância na saúde pública e veterinária, se encontra mundialmente distribuída, e é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000; Aguirre *et al.*, 2019). Este protozoário pertence ao filo Apicomplexa que inclui outros importantes patógenos como *Plasmodium* spp., *Neospora* spp. e *Eimeria* spp. (Jeffers *et al.*, 2018). *Toxoplasma gondii* pode infectar diferentes hospedeiros mamíferos como os seres humanos, sendo estes considerados hospedeiros intermediários, e membros da família *Felidae*, como os gatos domésticos, os quais são considerados os hospedeiros definitivos para *T. gondii* (Lyons & Johnson, 1995; Al-Adhroey *et al.*, 2019).

As formas mais comuns de adquirir toxoplasmose (Figura 1) são através da ingestão de água contaminada (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003), alimentos malcozidos ou crus, como carnes e vegetais (Tenter *et al.*, 2000) e leite *in natura* contaminados por *T. gondii* (Dubey, 1993), além de estudos recentes demonstrarem a presença de oocistos de *T. gondii* em frutos do mar (Bahia-Oliveira *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2018; Shapiro *et al.*, 2019). Tais formas de infecção supracitadas estão relacionadas a toxoplasmose adquirida. Medidas higiênicas relacionadas ao consumo de frutas, legumes e vegetais também auxiliam na redução da aquisição da infecção (Furtado *et al.*, 2011).

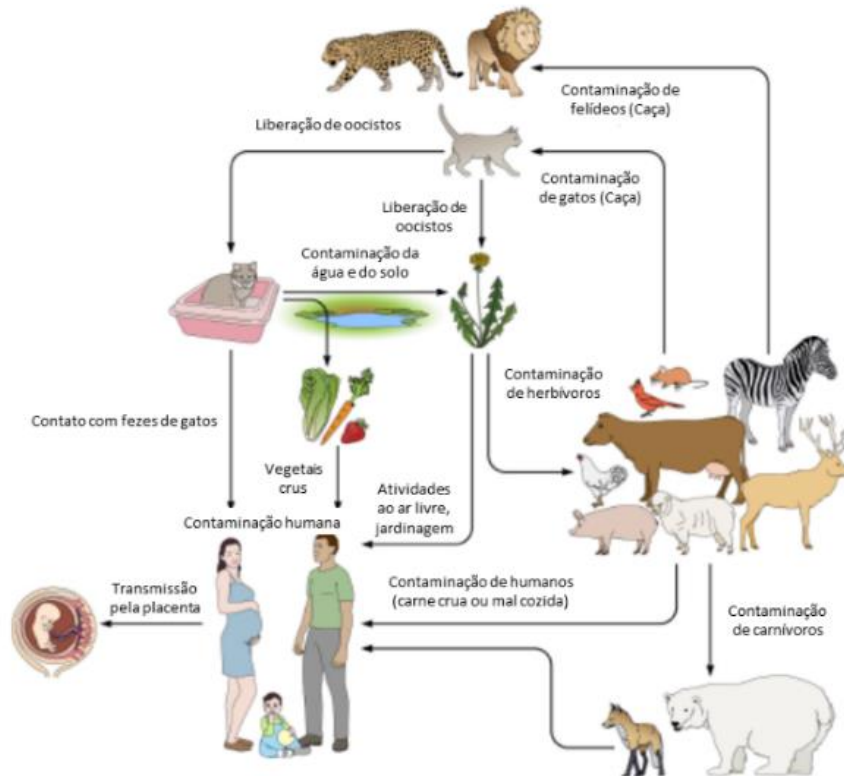


Figura 1. Vias de contaminação pelo *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose pode ser adquirida através do contato com oocistos liberados pelos felídeos que permanecem no ambiente. A ingestão de carne crua ou mal cozida contaminadas por cistos teciduais, transmissão transplacentária e consumo de vegetais crus também são formas de infecção pelo *T. gondii*. Atividades ao ar livre, como jardinagem, são via de contaminação através da presença de oocistos no solo (Traduzido de Robert-Gangneux & Dardéc, 2012).

Pelo menos um terço da população mundial está infectada por *T. gondii*, sendo a toxoplasmose considerada uma das doenças mais comuns do mundo (Mammari *et al.*, 2019). A detecção de imunoglobulinas que indicam infecção positiva para *T. gondii* pode chegar a 98% em algumas regiões, em especial na América do Sul e na África (Furtado *et al.*, 2011). No entanto, a maioria das infecções agudas são latentes e assintomáticas em hospedeiros imunocompetentes, levando o parasito a formar cistos teciduais em diferentes órgãos e ali permanecerem ao longo dos anos. Contudo, a reativação da infecção pode ocorrer caso haja comprometimento no sistema imune do hospedeiro, iniciando quadro de toxoplasmose aguda (Shen *et al.*, 2016) que pode vir a afetar a retina, por exemplo, e causar perda significativa da visão (Dunay *et al.*, 2018).

Em pacientes imunocomprometidos a infecção pode causar graves manifestações clínicas, como pode ocorrer com portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), gestantes que são acometidas pela

infecção e podem transmiti-la congenitamente, pacientes transplantados e pacientes com doenças que causam imunossupressão, como câncer, tuberculose entre outras (Dunay *et al.*, 2018).

2.1.2. Toxoplasmose congênita

A aquisição da infecção por gestantes pode causar toxoplasmose congênita que pode gerar graves consequências, ou até mesmo a morte do feto em cerca de 3% dos casos, principalmente durante o primeiro trimestre de gestação (Dunn *et al.*, 1999; Wallon *et al.*, 2013; Binquet *et al.*, 2019), visto que o parasito é capaz de atravessar a placenta (Weiss & Kimm, 2007). A provável causa da transmissão transplacentária é a entrada de taquizoítos na placenta, onde se proliferam rapidamente e são capazes de infectar os tecidos e a circulação do feto em formação (Tenter *et al.*, 2000, Arora *et al.*, 2017).

A incidência e gravidade da infecção variam de acordo com o tempo gestacional, indicando que quanto mais tarde ocorrer a infecção da mãe durante a gestação maiores são os riscos de contaminação materno-fetal, podendo causar o desenvolvimento de sintomas no bebê logo após o nascimento e ao longo de sua infância, como a inflamação da retina (retinocoroidite) e acúmulo de líquido céfalo-raquidiano no interior da cavidade craniana (hidrocefalia) (Tenter *et al.*, 2000; Wallon *et al.*, 2013; Binquet *et al.*, 2019). Infecções adquiridas antes do período gestacional são consideradas mais seguras e com menores riscos de danos ao feto (Elmore *et al.*, 2010). Cerca de 10 a 23% dos bebês que desenvolvem a infecção durante a gestação podem apresentar as três principais sequelas da doença: retinocoroidite, hidrocefalia e calcificações intracranianas (Tenter *et al.*, 2000).

O tratamento de gestantes é diferenciado e se dá através da administração de espiramicina, antibiótico ativo que age contra a forma taquizoíto do parasito (Garin & Eyles, 1958; Niel *et al.*, 1981), a fim de que seja reduzida a proliferação do parasito e a transmissão materno-fetal. O tratamento pré-natal e neonatal de gestantes pode ajudar a reduzir os riscos de aparecimento de sintomas da toxoplasmose congênita no recém-nascido, bem como a morte do feto durante a gestação (Dunay *et al.*, 2018; Binquet *et al.*, 2019).

2.1.3. Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular é a manifestação clínica mais comum durante infecção pelo *T. gondii*, principalmente nos países latino-americanos como Colômbia e Brasil (Furtado *et al.*, 2012). Está associada a infecção congênita e infecção adquirida e é considerada a principal causa de retinocoroidite que pode levar a perda da visão em seus portadores (Ferreira *et al.*, 2013). Em casos de toxoplasmose congênita, os pacientes infantis podem desenvolver catarata seguida de retinocoroidite (Park & Nam, 2013).

Durante anos acreditou-se que a maior via de desenvolvimento de toxoplasmose ocular era através da via congênita, porém, estudos demonstraram que a infecção pós-natal também é causa importante para desenvolvimento de toxoplasmose ocular (Grigg *et al.*, 2015). No Brasil, a retinocoroidite é mais comum e se desenvolve mais gravemente quando comparada a países europeus e norte-americanos, com prevalência de 2 a 25% no nordeste do Brasil em adolescentes e adultos que contraíram a infecção após o nascimento (Gilbert *et al.*, 2008).

As lesões oculares derivadas da toxoplasmose podem ocorrer devido a invasão direta do parasito no tecido ocular (Furtado *et al.*, 2011), produzindo um foco de inflamação na retina e levando a degradação dos tecidos circundantes e necrose (Park & Nam, 2013). O atual tratamento para toxoplasmose ocular é feito através da utilização de sulfadiazina, pirimetamina e corticosteroides. No entanto, existem fatores que impedem o curso efetivo do tratamento, como a formação de cistos pelo parasito que são resistentes ao tratamento (Maenz *et al.*, 2014).

2.1.4. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos

A toxoplasmose é assintomática na maioria dos casos quando se trata de pacientes imunocompetentes (Tenter *et al.*, 2000). No entanto, em pacientes com imunidade deficiente devido a fatores clínicos, como pacientes portadores do vírus da SIDA ou que estejam recebendo terapia imunossupressora, por exemplo, a doença pode levar ao desenvolvimento de sintomas graves (Weiss & Dubey, 2009).

Em pacientes imunocomprometidos a toxoplasmose pode se desenvolver através de infecção adquirida ou da reativação de infecção e pode ser fatal

(Robert-Gangneux *et al.*, 2015). A reativação pode ocorrer através da ruptura de um cisto tecidual pré-existente e causa principalmente efeitos neurológicos, como encefalite e convulsões, além de outras doenças sistêmicas como pneumonia (Robert-Gangneux & Dardé, 2012; Wang *et al.*, 2017).

Para pacientes oncológicos o risco de reativação latente da toxoplasmose pode ocorrer durante o tratamento com quimioterápicos por suprimirem a imunidade, como no caso de leucemia, linfomas e mieloma (Wang *et al.*, 2017). Em pacientes portadores da SIDA, a toxoplasmose está entre as 10 doenças mais comuns, e é uma doença oportunista que causa efeitos graves no sistema nervoso central, levando o paciente a desenvolver distúrbios de comportamento e de personalidade (Weiss & Kim, 2011).

2.1.5. Epidemiologia da toxoplasmose

A epidemiologia da toxoplasmose (Figura 2) é complexa e envolve vários fatores que dificultam o controle e prevenção da doença (Tenter *et al.*, 2000). Fatores ambientais e geográficos, socioculturais e econômicos, idade do hospedeiro, vias de contaminação, temperatura do ambiente e genética do parasito são exemplos de fatores que se incluem na epidemiologia da toxoplasmose (Furtado *et al.*, 2012).

Os gatos domésticos são provavelmente a fonte principal de propagação da doença, visto que esse hospedeiro pode liberar milhões de oocistos a partir da ingestão de um cisto tecidual e está inserido culturalmente nas nossas vidas (Hill *et al.*, 2005). Estima-se que sorologia positiva para *T. gondii* se aproxime de 100% em gatos não domesticados, enquanto para gatos domésticos esse número esteja entre 30-40% (Elmore *et al.*, 2010; Maenz *et al.*, 2014). A ingestão de oocistos liberados pelos hospedeiros definitivos e encontrados no meio ambiente é uma das principais formas de infecção pelo *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2012).

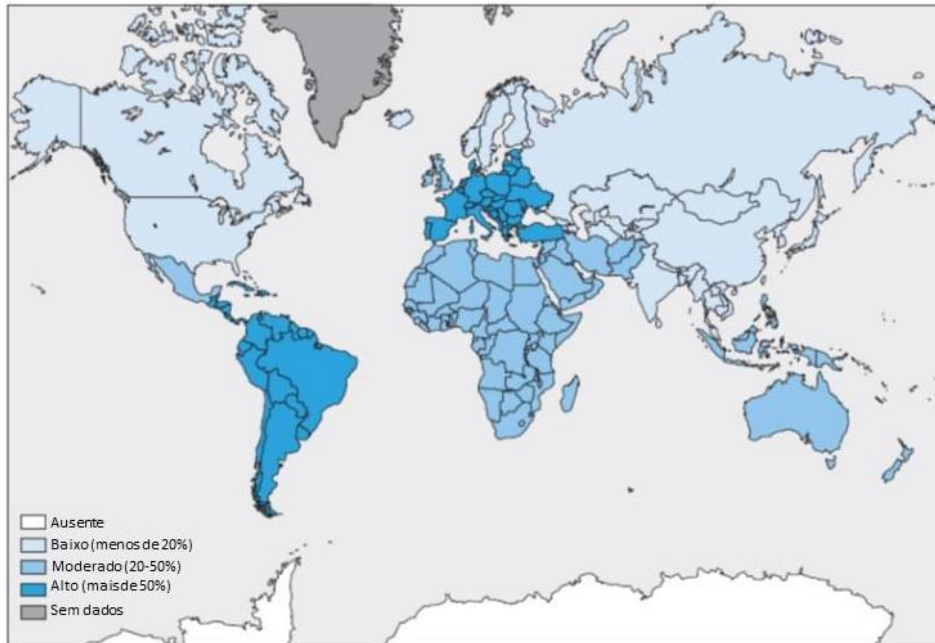


Figura 2. Distribuição geográfica da prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* pelo mundo (Traduzido de Hill & Dubey, 2014).

2.2. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (toxon = arco, plasma = forma) foi descrito no Brasil por Splendore (1908), em coelho, e no mesmo ano por Nicolle & Manceaux em roedor (*Ctenodactylus gundi*) no Norte da África. O primeiro caso de toxoplasmose congênita em humanos foi descrito por Wolf e Cowen (1937). Os protozoários do filo Apicomplexa englobam cerca de 500 espécies de parasitos intracelulares obrigatórios, como *T. gondii*. Este parasito pertence ao Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma*, Espécie *Toxoplasma gondii* (Nishi *et al.*, 2008).

2.2.1. Ciclo de vida

Toxoplasma gondii possui ciclo de vida heteroxênico e pode infectar diferentes tipos de células e tecidos por ser parasito intracelular obrigatório (Tenter *et al.*, 2000). O ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 3) nos hospedeiros definitivos se inicia após a ingestão de cistos teciduais ou oocistos que terão sua parede cística rompida através da ação de enzimas proteolíticas presentes no estômago e no intestino. Os bradizoítos ou esporozoítos recém-liberados

penetram nas células epiteliais do intestino delgado (Dubey *et al.*, 1998) e iniciam o desenvolvimento de gerações assexuadas e sexuadas de *T. gondii*.

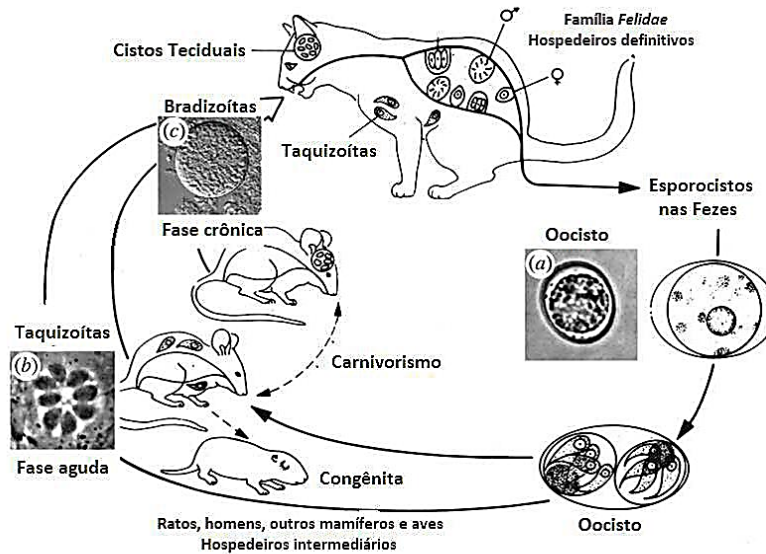


Figura 3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Reprodução sexual ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos. A liberação de oocisto pelas fezes representa a via fecal-oral da infecção. (a) Oocistos esporulam no ambiente e contaminam água e alimentos. (b) Na fase aguda da infecção taquizoítos se multiplicam rapidamente. (c) Na fase crônica da infecção há a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos. A contaminação através de cistos por via oral reinicia o ciclo no hospedeiro definitivo. Outras vias de contaminação incluem carnivorismo e transmissão congênita (Traduzido de Sibley *et al.*, 2009).

Nas células dos hospedeiros, os parasitos se dividem por endodiogenia no vacúolo parasitóforo (VP) que é formado logo após a invasão e consiste em um pequeno espaço formado pela membrana da célula hospedeira (Hill & Dubey, 2014). Os ciclos de divisão do parasito nas células epiteliais intestinais (ciclo enteroepitelial) caracteriza o estágio de esquizogonia com a formação de esquizontes contendo merozoítos. Os merozoítos são liberados dos esquizontes e diferenciam-se em gametas masculinos e femininos (Hill *et al.*, 2005; Dubey, 2009). O gameta masculino possui dois flagelos que os transportam ao gameta feminino. A fusão dos gametas resulta na formação de zigotos que possuem uma barreira protetora em sua volta o caracterizando, então, como oocisto (Hill *et al.*, 2005). Os oocistos serão liberados no ambiente através das fezes e irão esporular no ambiente em um período de aproximadamente 3-5 dias nas condições ambientais adequadas. Estes oocistos são a via de infecção fecal-oral por *T. gondii* e podem contaminar os diferentes hospedeiros (Wong & Remington, 1993).

Após a contaminação dos hospedeiros, o processo de liberação de bradizoítos e esporozoítos se assemelha ao que ocorre nos hospedeiros definitivos. O rompimento da parede dos cistos ou oocistos através da ação de enzimas proteolíticas causa a diferenciação para taquizoítos. (Furtado *et al.*, 2011). Os taquizoítos se multiplicam rapidamente nas células hospedeiras nucleadas, caracterizando a fase aguda da infecção (Sibley *et al.*, 2009), e ativam resposta imune do hospedeiro, ocorrendo a eliminação de grande parte dos parasitos. No entanto, parasitos que resistem a ação do sistema imune se convertem a bradizoítos e permanecem de forma latente nas células de tecidos do organismo hospedeiro, iniciando a fase crônica da doença através da formação de cistos teciduais (Blader & Saeji, 2009).

Os cistos teciduais são formados a partir do VP e são capazes de se desenvolver e permanecer em tecido nervoso e muscular do hospedeiro por tempo indeterminado, com cada cisto podendo conter centenas de bradizoítos (Gross *et al.*, 1996). Dois fatores podem atuar na conversão de taquizoítos a bradizoítos formando cistos teciduais: a conversão pode ser espontânea, com posterior ação do sistema imune do hospedeiro, ou o sistema imune age causando estresse sob os taquizoítos que se convertem a bradizoítos como mecanismo de sobrevivência no organismo hospedeiro (Gross *et al.*, 1996).

2.2.2. Ciclo de vida intracelular

2.2.2.1. Ciclo lítico

É bem descrito que a invasão de células por patógenos depende da interação de receptores de membrana de alta afinidade do patógeno e da célula hospedeira. Para *T. gondii* essa característica se diferencia de outros parasitos já que é capaz de infectar diversos tipos de células, exigindo que sua membrana possua diferentes classes de receptores (Black & Boothroyd, 2000).

Após a invasão de células intestinais, os esporozoítos se convertem a taquizoítos que irão se dividir dentro do VP, o qual tem composição controlada pelo parasito e utiliza lipídeos derivados da membrana plasmática da célula hospedeira (Blader & Saeji, 2009). Diversos ciclos de divisão por endodiogenia ocorrem no vacúolo, com a posterior saída ativa dos parasitos da célula hospedeira, que é destruída durante o processo através da ruptura de sua membrana. Repetidos ciclos de invasão e egresso da célula hospedeira

caracterizam o ciclo lítico de *T. gondii* (Figura 4) (Blader *et al.*, 2015; Triana *et al.*, 2018).

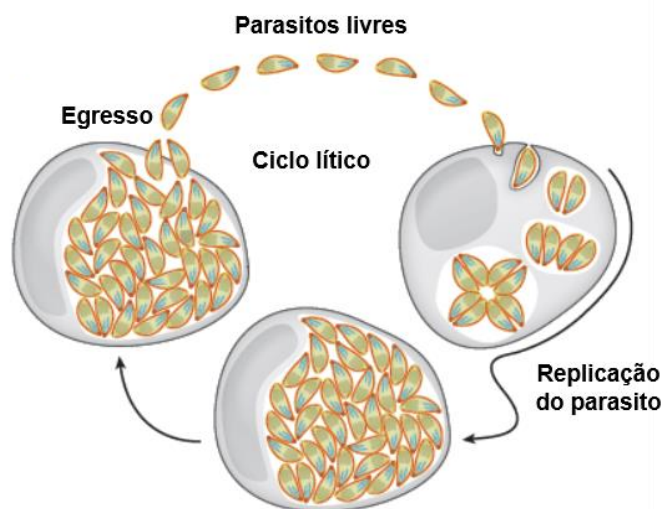


Figura 4. Representação do ciclo lítico de *Toxoplasma gondii*. O ciclo lítico se inicia com a invasão de células hospedeiras pelo *T. gondii*. O parasito se replica diversas vezes e rompe a membrana da célula hospedeira, causando seu egresso e posterior invasão a células vizinhas, onde o ciclo se reinicia (Traduzido de Blader *et al.*, 2015).

2.3. Ultraestrutura de *Toxoplasma gondii*

Existem três formas infectivas distintas que estão relacionadas intimamente ao ciclo de vida de *T. gondii*: os taquizoítos que se proliferam rapidamente, bradizoítos que se dividem lentamente e formam os cistos teciduais e os esporozoítos que são encontrados no interior dos oocistos. Todas as formas são constituídas por uma membrana que está associada ao citoesqueleto, responsável por manter a estrutura e a motilidade do parasito (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Parasitos quando estão fora da célula hospedeira não se dividem, possuem alta motilidade e secretam diversas moléculas que auxiliam no processo de invasão da célula hospedeira (Blader *et al.*, 2015). Parasitos intracelulares são capazes de se dividir no VP, possuem baixa motilidade e secretam poucas moléculas, com seu gasto energético voltado para processo de divisão (Blader *et al.*, 2015).

Parasitos do filo Apicomplexa possuem organelas especializadas que caracterizam o complexo apical, de onde deriva seu nome. Essa região fica localizada na parte anterior do corpo dos parasitos e engloba organelas especializadas que atuam na secreção de moléculas durante invasão da célula hospedeira, as róprias, micronemas e grânulos densos (de Souza, 2006).

2.3.1. Taquizoítos

Frenkel (1973) denominou taquizoíto (tachos = do grego, rápido) o estágio de rápida proliferação de *T. gondii*. O taquizoíto possui formato similar a meia-lua (Figura 5), medindo cerca de 2-6 μm (Dubey *et al.*, 1998) e foi visualizado primeiramente em roedor por Nicolle e Manceaux (1908) no norte da África, enquanto no Brasil foi identificado por Splendore (1908) em coelhos. Este estágio de vida do parasito pode infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro intermediário e células não-intestinais do hospedeiro definitivo (Dubey, 1993).

Por sua característica intracelular, o taquizoíto possui diversas organelas secretoras e corpos de inclusão que regulam seu desenvolvimento e manutenção na célula hospedeira (Dubey *et al.*, 1998; Black & Boothroyd, 2000). Esta forma possui organelas especializadas como os micronemas, róptrias e grânulos densos, além de organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Dubey, 1993).

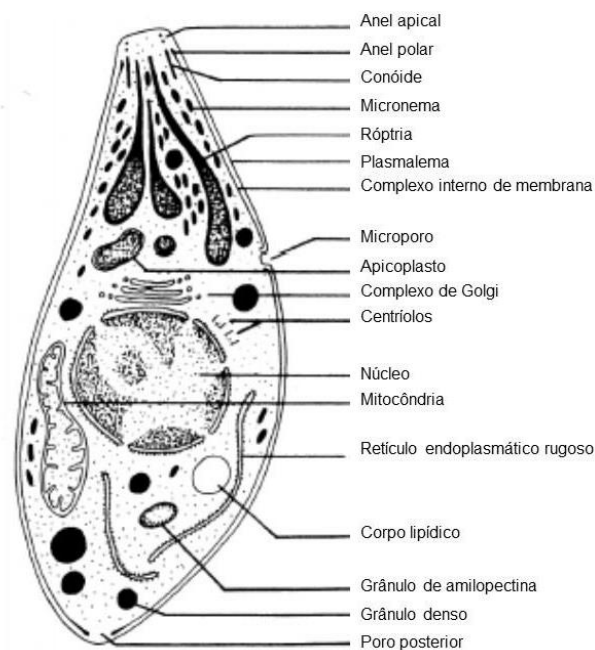


Figura 5. Esquema da ultraestrutura da forma taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. A forma taquizoíto apresenta núcleo centralizado, organelas típicas de células eucarióticas e poucos grânulos de amilopectina Traduzido de Dubey *et al.* (1998).

A locomoção dos taquizoítos ocorre a partir de deslizamento (gliding), movimentos ondulatórios e rotatórios, porém, *T. gondii* não apresenta nenhuma estrutura específica de locomoção, como cílios, flagelos ou pseudópodes (Dubey *et al.*, 1998). Os taquizoítos invadem as células hospedeiras pelo mecanismo de

penetração ativa formando logo após sua entrada o VP (Dubey, 1993) que é produzido a partir da membrana da célula hospedeira (Hu *et al.*, 2002). Eles podem permanecer no VP devido a característica de que o vacúolo não se funde com os lisossomos da célula hospedeira, impedindo sua degradação por ação de enzimas lisossomais (Gross *et al.*, 1996).

A endodiogenia (Figura 6) consiste na formação de duas células-filhas no interior da célula-mãe, que é consumida ao final do processo (Blader *et al.*, 2015). Esse processo pode levar de 6 a 9 horas, levando a ruptura da célula hospedeira e invasão de células adjacentes a ela (ciclo lítico), além da ativação de forte resposta imune pelo organismo hospedeiro que controla a infecção mas não é capaz de eliminar o parasito (Sibley *et al.*, 2009).

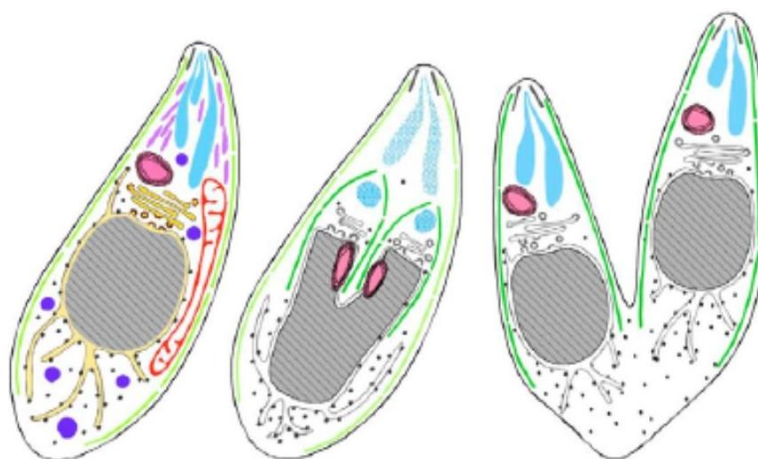


Figura 6. Processo de divisão por endodiogenia de *Toxoplasma gondii*. A divisão por endodiogenia ocorre a partir da célula-mãe e, ao final do processo, duas células-filhas serão formadas, com degradação da célula-mãe ao final do processo (Nishi *et al.*, 2008).

2.3.2. Bradizoítos e cistos teciduais

O termo bradizoíto foi dado por Frenkel (1973) para caracterizar a forma de proliferação lenta de *T. gondii* que levará ao desenvolvimento de infecção crônica e latente no organismo hospedeiro. Características como a espécie do hospedeiro intermediário podem afetar diretamente o processo de conversão dos taquizoítos a bradizoítos, bem como a formação dos cistos teciduais (Skariah *et al.*, 2010). Os bradizoítos pouco diferem em termos de ultraestrutura da forma taquizoíto (Figura 7) (Weiss & Kim, 2011), pois possuem núcleo localizado na parte posterior, enquanto em taquizoíto o núcleo se apresenta centralizado. (Dubey *et al.*, 1998). Apresentam maior quantidade de micronemas e grânulos

de amilopectina que servem como reserva energética para permanecerem viáveis durante a fase crônica da doença (Weiss & Kim, 2011) que podem ser raros ou ausentes em taquizoítos (Dubey *et al.*, 1998).

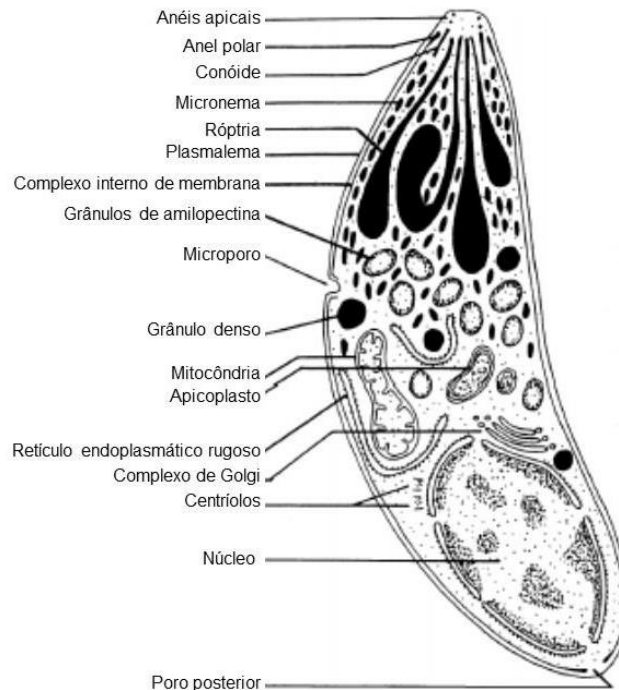


Figura 7. Esquema da ultraestrutura de bradizoíto de *Toxoplasma gondii*. A forma bradizoíto apresenta núcleo localizado na região posterior, organelas típicas de células eucarióticas e presença de grânulos de amilopectina que atuam como reservatórios energéticos para o parasito. Apresentam também organelas secretoras como róptrias, micronemas e grânulos densos (Traduzido de Dubey *et al.*, 1998).

Os cistos teciduais são formados por bradizoítos e consistem em um mecanismo de estabelecimento de infecção crônica no organismo hospedeiro sem que haja interação com o sistema imune, evitando sua eliminação (Blader & Saeji, 2009). O consumo de cistos teciduais através de carne mal cozida ou crua, por exemplo, é a segunda maior via de contágio pelo *T. gondii* e é a principal via de contaminação dos hospedeiros definitivos (Blader *et al.*, 2015). Os cistos permanecem intracelulares e os bradizoítos se proliferam por endodiogenia, com sua presença prevalecendo em tecido neural e muscular, mas pode estar presente também em órgãos como pulmões, fígado e baço (Gross *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1998).

A reativação da infecção pelo *T. gondii* ocorre quando há supressão do sistema imune do hospedeiro, levando a conversão dos bradizoítos a taquizoítos

e ao desenvolvimento de infecção aguda (Jeffers, 2018), que pode ser fatal em pacientes imunocomprometidos (Hu *et al.*, 2002).

2.4. Tratamento para toxoplasmose

O tratamento inicial contra toxoplasmose ocorreu com a descoberta da eficácia de sulfonamidas durante tratamento de camundongos infectados por *T. gondii* (Sabin & Warren, 1942, Dunay *et al.*, 2018). Posteriormente, a combinação sinérgica de sulfonamidas com pirimetamina se mostrou eficaz (Beverley, 1973), sendo esta combinação utilizada atualmente para tratamento da toxoplasmose em humanos (Remington *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2015). A administração destes fármacos gera efeitos colaterais, como a supressão medular, sendo contraindicado para pacientes gestantes por ser teratogênico.

Além dos efeitos colaterais, a combinação desses fármacos atua negativamente no metabolismo de ácido fólico no organismo, sendo indicada sua administração simultânea pelos pacientes durante o tratamento (revisado por Haverkos, 1987, Dunay *et al.*, 2018). Em pacientes alérgicos à sulfadiazina, o tratamento é feito a partir do uso de clindamicina conjugada à pirimetamina (Dannemann *et al.*, 1992; Katlama *et al.*, 1996; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Foi descrito que o antibiótico espiramicina é um agente não-tóxico e não-teratogênico eficaz para o tratamento de gestantes (Nye, 1979; Moncada & Montoya, 2012), sendo este o tratamento alternativo atualmente utilizado nos casos de toxoplasmose congênita. Entretanto, a administração deste fármaco não apresenta grande eficácia (Nath & Sinai, 2003) quando comparado à combinação de sulfadiazina e pirimetamina. Posteriormente, foi descrita a eficácia de clindamicina no tratamento de pacientes alérgicos a sulfonamidas (McMaster *et al.*, 1973; Araujo & Remington, 1974; Rajapakse *et al.*, 2013).

2.4.1. Sulfadiazina

Sulfadiazina (C₁₀H₁₀N₄O₂S) (Figura 8) é molécula pertencente a classe das sulfonamidas e foi descoberta por um estudante alemão em 1908, porém, seu potencial terapêutico só foi descoberto posteriormente (Petersdorf, 1984). A eficácia das sulfonamidas para casos de toxoplasmose foi primeiramente descrita por Sabin & Warren (1942).

Atualmente, o tratamento para toxoplasmose se baseia na administração de sulfadiazina combinada à pirimetamina que possui atividade contra taquizoítos de *T. gondii* através da inibição de enzimas como a di-hidropteroato sintase (DHPS) e di-hidrofolato redutase (DHFR), responsáveis pela síntese de compostos folato, como o ácido folínico, que possuem papel fundamental na sobrevivência do parasito (Doliwa, 2013).

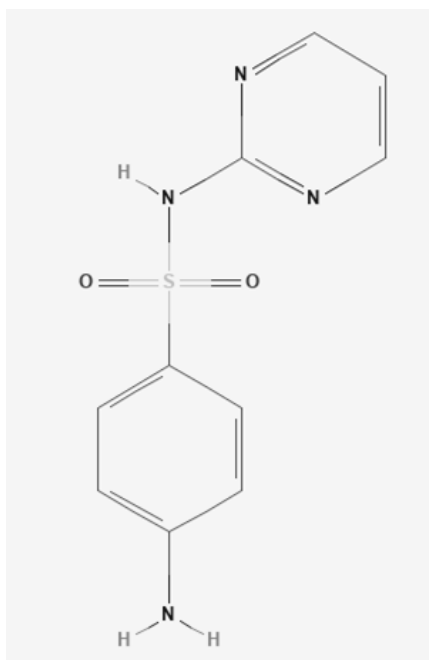


Figura 8: Estrutura química da Sulfadiazina (Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadiazine>).

2.4.2. Pirimetamina

A pirimetamina (C₁₂H₁₃ClN₄) (Figura 9) foi primeiramente utilizada como antimalárico por Falco *et al.* (1951). Em 1952, Hitchings e colaboradores descreveram que a pirimetamina afeta diretamente a produção de folatos pelo organismo, sendo denominada, então, como antagonista de ácido folínico.

A pirimetamina possui atividade microbicida para *T. gondii* através da inibição da síntese de folato pelo parasito, impedindo a produção de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) e levando ao seu colapso (Beverley & Fry, 1957). A supressão da medula óssea causada pelo tratamento com pirimetamina pode ser revertida através da redução da dosagem ou interrupção do tratamento (Ben-Harari *et al.*, 2017).

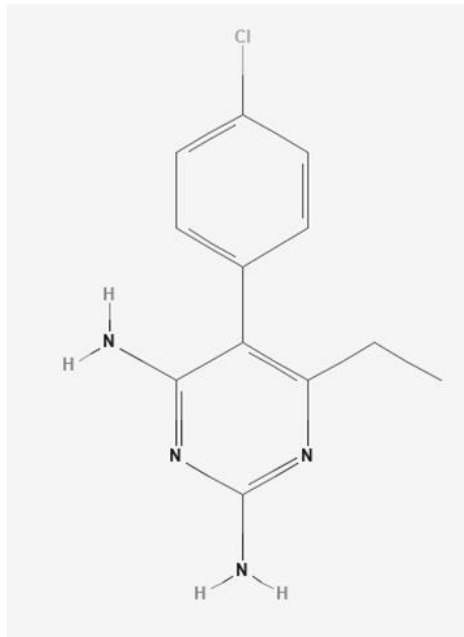


Figura 9: Estrutura química da Pirimetamina (Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrimethamine>).

2.4.3. Espiramicina

Espiramicina (C₄₃H₇₄N₂O₁₄) (Figura 10) foi isolada por Pinnert-Sindico (1956) e se assemelha à eritromicina, fornecendo eficaz ação antibacteriana. É um antibiótico derivado de *Streptomyces ambofaciens* e apresenta atividade contra *T. gondii*, sendo utilizada em vários países para o tratamento de toxoplasmose congênita por não apresentar evidências de danos ao feto ao longo do tratamento (Chang & Pechère, 1988).

Para casos de toxoplasmose ocular a espiramicina foi descrita como tratamento alternativo à sulfadiazina e pirimetamina por ser considerada não-tóxica (Cassady *et al.*, 1963) e permanecer em uma concentração eficaz na placenta três vezes maior do que a concentração presente no soro materno (Grujic *et al.*, 2005). No entanto, a utilização da espiramicina demonstrou menor eficácia quando comparada a combinação de sulfadiazina e pirimetamina no que diz respeito à diminuição da proliferação de *T. gondii* (Dunay *et al.*, 2018).

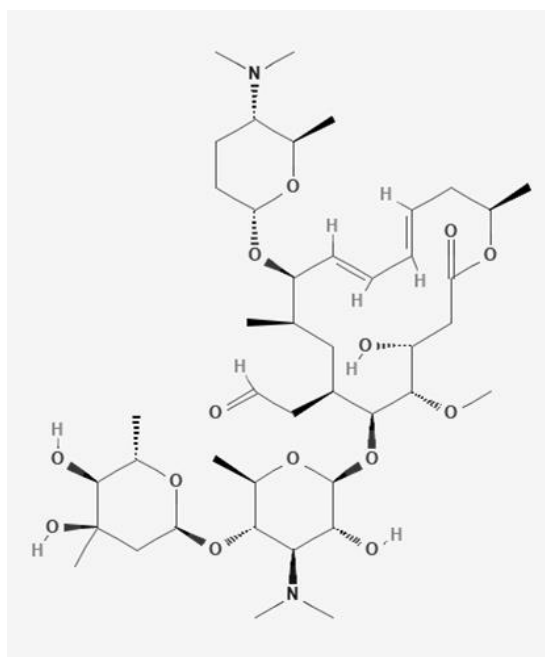


Figura 10: Estrutura química da Espiramicina (Retirado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spiramycin#section=2D-Structure>).

2.4.4. Clindamicina

A clindamicina ($C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$) (Figura 11) é o derivado da classe de antibióticos lincosamina considerado clinicamente relevante em casos de infecção por estreptococos e estafilococos (Morar *et al.*, 2009). Este fármaco atua inibindo a síntese de proteínas bacterianas, exibindo efeito prolongado mesmo após a suspensão do tratamento e é bem absorvida pela maioria dos tecidos, exceto o sistema nervoso central (Smieja, 1998).

O uso da clindamicina durante infecção aguda da toxoplasmose foi primeiramente descrito por McMaster e colaboradores (1973). Em 1974, Araujo & Remington descreveram a utilização da clindamicina em casos de infecção aguda e crônica em camundongos e para prevenção da transmissão da toxoplasmose congênita, demonstrando proteção contra os efeitos gerados pela infecção aguda e contra os cistos teciduais durante infecção crônica. Para toxoplasmose cerebral foi descrito que a clindamicina não apresenta eficácia garantida, já que o fármaco não é capaz de se distribuir efetivamente no tecido nervoso (Smieja, 1998). Blais e colaboradores (1993) demonstraram que a clindamicina atua na síntese de proteínas de taquizoítos, corroborando os dados anteriormente descritos para bactérias, e reduz sua capacidade de infectar

células hospedeiras, porém, após a invasão a clindamicina apresenta pouco ou nenhum efeito intracelular.

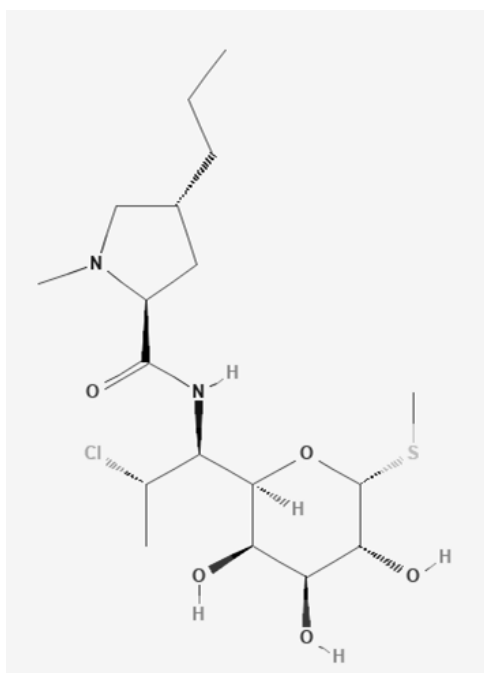


Figura 11. Estrutura química da Clindamicina. (Retirado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clindamycin#section=2D-Structure>. Acessado em 23/02/2020).

2.4.5. Efeitos colaterais e mecanismos de resistência

Toxoplasma gondii apresenta características que tornam esse parasito um desafio em termos de terapia medicamentosa, pois atravessa a barreira hematoencefálica e estabelece infecção com bradizoítos resistentes a fármacos, indicando que o medicamento ideal para o tratamento alcance concentrações terapêuticas, sistêmicas, cerebrais e oculares e seja capaz de eliminar o estágio latente da doença (Alday & Dogget, 2017). Araujo & Remington (1974) atentaram para a necessidade do desenvolvimento de fármacos não-tóxicos que possam ser utilizados para tratamento em bebês, gestantes e pacientes imunocomprometidos.

Os tratamentos atualmente utilizados desenvolvem efeitos colaterais graves, como leucopenia, trombocitopenia, neutropenia, além de reações incomuns como necrose hepática que pode ser fatal (Montazeri, 2018). O aparecimento de efeitos colaterais pode estar relacionado a atuação no metabolismo de ácido folínico durante o tratamento, causando deficiência dessa substância e levando ao desenvolvimento de efeitos hematológicos (Montazeri,

2018). Tais falhas terapêuticas e a resistência do parasito aos fármacos atualmente utilizados podem ter relação com o hospedeiro, como má absorção ou intolerância ao fármaco, ou fatores característicos do parasito, como susceptibilidade diferenciada entre cepas (Pramanik, 2019). Cerca de 10-20% dos casos de falhas no tratamento demonstram ligação com resistência do parasito aos fármacos utilizados, porém, o mecanismo de resistência aparenta ser maior quando se trata das sulfonamidas, o que torna este fato preocupante já que envolve fármaco do tratamento de primeira linha contra toxoplasmose (Alday & Doggett, 2017).

2.5. Melatonina

A melatonina é molécula altamente conservada evolutivamente e pode ser encontrada desde procariontes fotossintéticos, mas também folhas, frutos e sementes e todos os seres vertebrados (Bagnaresi *et al.*, 2012; Claustrat & Leston, 2013; Zhang & Zhang, 2014). É produzida principalmente pela glândula pineal e regula a fisiologia endócrina do ciclo circadiano, além de influenciar o funcionamento de diversos tecidos que não compõem o sistema endócrino (Ambriz-Tututi *et al.*, 2009). Outros sítios de produção de melatonina foram descritos, incluindo a retina (Cardinali & Rosner, 1971, Tosini & Menaker, 1998), medula óssea (Conti *et al.*, 2000) e pele (Slominski *et al.*, 2005).

A melatonina exibe perfil de alta solubilidade em água e lipídeos, facilitando sua permeabilidade entre membranas celulares (Claustrat & Leston, 2013). Sua funcionalidade depende de receptores de membrana específicos de alta afinidade que pertencem ao subtipo de proteína G, denominados MT1 e MT2. Um terceiro receptor, MT3, foi caracterizado como uma enzima quinona redutase que está diretamente ligada a proteção contra estresse oxidativo (Nosjean *et al.*, 2000; Pandi-Perumal *et al.*, 2008).

2.5.1. A glândula pineal

A glândula pineal foi descrita por um médico anatomista grego, Herófilo, no século III e atribuiu a ela a função de regular o fluxo de pensamentos no sistema ventricular do cérebro. Cerca de meio século após suas primeiras descrições, Galeno observou que a estrutura descrita por Herófilo apresentava características diferentes do sistema nervoso, mas havia semelhanças com

glândulas. Durante este período de descoberta da glândula pineal acreditava-se que os ventrículos do cérebro estavam preenchidos com espíritos de animais (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Durante o século XVII, René Descartes descreveu a glândula pineal como um “terceiro olho” e seria o local onde alma e corpo se encontravam e interagiam, isto porque sua localização está centralizada e é a única estrutura do encéfalo que não possui dois hemisférios (Simonneaux & Ribelayga, 2003; Berhouma, 2013). Em 1958, Lerner e colaboradores descreveram a associação entre a glândula pineal, a produção e a secreção de melatonina, sendo classificada como glândula endócrina por liberar de forma direta a melatonina no sangue e no líquido céfalorraquidiano (Patel *et al.*, 2019).

2.5.2. O ciclo circadiano

Os ciclos circadianos (em latim, “circa” = aproximadamente; “diem” = dia) sofrem alterações bioquímicas ao longo do dia e são evolutivamente conservados para manter a sincronização da atividade fisiológica no ambiente, se ajustando a hora e ao local (Robinson & Reddy, 2014). Nos seres humanos o ritmo circadiano controla diversos aspectos internos e externos, como temperatura, frequência cardíaca, concentração de cortisol e produção de hemácias, além de características comportamentais como o sono-vigília.

A atividade fisiológica mais importante do ciclo circadiano é a secreção do hormônio melatonina (Sapède & Cau, 2013). Efeitos desse hormônio estão diretamente envolvidos com a ausência ou presença de luminosidade e sua adaptação por fotorreceptores da retina ao longo das variações de intensidade durante o dia (Vanecek, 1998). Alterações no ciclo circadiano causadas pelo ambiente podem alterar o ciclo do sono-vigília e gerar diversos distúrbios do sono, indicando seu papel fundamental desde o controle do metabolismo corporal até a qualidade do sono. Outra função controlada pelo ciclo circadiano é o ciclo celular, levando ao entendimento do processo de divisão descontrolado de células cancerígenas (Farhud & Aryan, 2018).

2.5.3. Biossíntese da melatonina

A biossíntese de melatonina (Figura 12) se inicia a partir da captação pelos pinealócitos do aminoácido triptofano que é encontrado livre na corrente

sanguínea e convertido a 5-hidroxitriptofano (TPOH). Esse produto sofre descarboxilação pela descarboxilase de ácidos aromáticos (AAAD) e se converte a serotonina. Caso a produção de serotonina esteja ocorrendo com presença de luz, essa molécula vai para a corrente sanguínea e caracteriza a “fase clara” do ciclo circadiano. A denominada “fase escura” se inicia com a N-acetilação da serotonina pela enzima alrilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) e passa a N-acetilserotonina (NAS), que é responsável por ativar a glândula pineal durante a noite. A produção de melatonina continua com a metilação da NAS pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase, formando o produto melatonina, que é liberada na corrente sanguínea (Bagnaresi *et al.*, 2012).

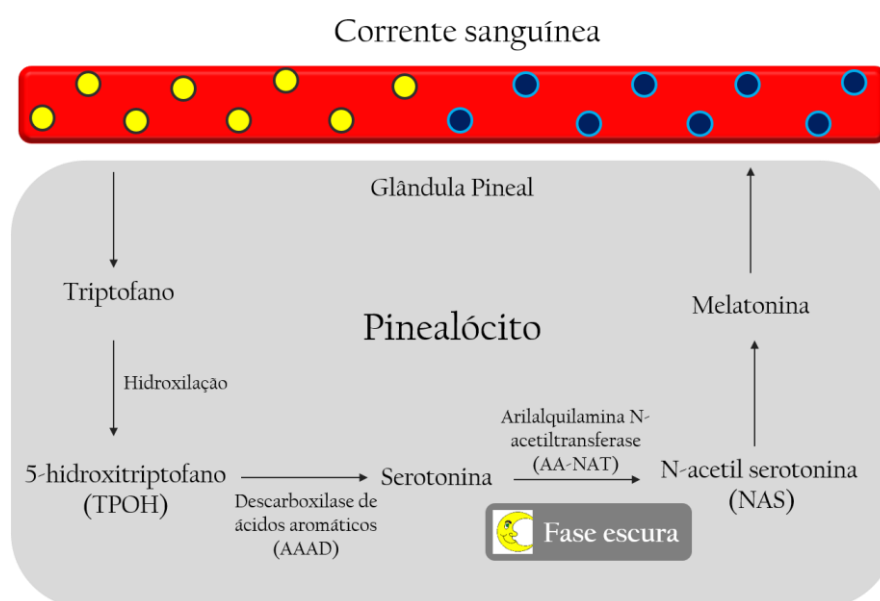


Figura 12. Esquema da biossíntese de melatonina. O triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano e, logo após, a serotonina que marca a fase clara da produção. Durante a fase escura, a serotonina é convertida a N-acetil-serotonina e depois a melatonina, que é liberada na corrente sanguínea (Adaptado de Bagnaresi *et al.*, 2012).

2.5.4. Melatonina e seu papel na imunidade

A produção de melatonina envolve fatores que estão regulados durante todo o processo, como a presença ou ausência de luminosidade ao longo do dia. Esta regulação implica no controle de processos metabólicos e fisiológicos importantes no organismo, através da manutenção das funções do sistema imune (Carrillo-Vico *et al.*, 2013) causadas pelo seu ritmo de produção altamente controlados, atuando diretamente na imunidade pela ativação de células

específicas de defesa, confirmando sua relevância biológica e imunológica (Markus *et al.*, 2018).

O efeito da melatonina na imunidade (Figura 13) através de ação neuroimunomoduladora é embasado na presença de receptores específicos para melatonina em células presentes em órgãos imunológicos, tanto na membrana plasmática quanto no núcleo (Calvo *et al.*, 2013; Carrillo-Vico *et al.*, 2013).

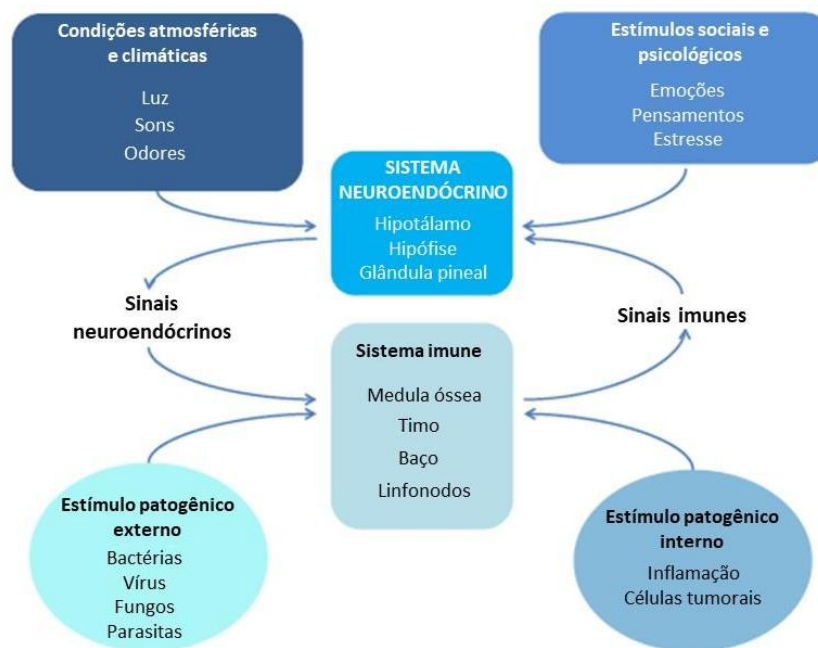


Figura 13. Esquema das interações entre os sistemas imune e neuroendócrino através de sinalização específica desencadeada por estímulos internos e externos. Duas vias de sinalização interdependentes podem ocorrer entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune. Na primeira, estímulos ambientais e fatores sociais e psicológicos ativam o sistema neuroendócrino. Este, por sua vez, envia sinais ao sistema imune que se ativa e aumenta a produção de células de defesa por seus órgãos especializados. A segunda via pode ocorrer após estímulos patogênicos de diferentes origens que irão ativar o sistema imune. A sinalização chega ao sistema neuroendócrino que irá controlar o sistema imune durante a defesa contra o patógeno (Adaptado de Calvo *et al.*, 2013).

2.6. Quimioterapia com melatonina

2.6.1. Tripanossomíase e melatonina

Trypanosoma cruzi é parasito causador da doença de Chagas que representa grave problema de saúde pública principalmente na América Latina, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas por esse parasito

(Álvarez *et al.*, 2014). A doença se divide em duas fases características, a fase aguda que se inicia logo após a infecção pelo *T. cruzi* e pode durar semanas, e a fase crônica que leva os pacientes chagásicos a desenvolverem doenças que podem ser digestivas e/ou cardíacas e levar a morte (Brazão *et al.*, 2011). A infecção de hospedeiros humanos ocorre principalmente pela entrada do parasito por mucosas ou através da pele lesionada que entra em contato com as fezes contaminadas do triatomíneo, vetor da doença (Álvarez *et al.*, 2014), porém, transfusão de sangue e transplante de órgãos também podem transmitir a doença (Cardinali & Álvarez, 2011).

A resposta imune inata do hospedeiro para combater *T. cruzi* envolve a produção de citocinas, incluindo interferon (IFN) que aumenta a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos, promovendo ação microbicida, e de interleucinas (Cardinali & Álvarez, 2011). A melatonina é capaz de reduzir a atividade da enzima óxido nítrico sintase-induzível (iNOS), intensificando seu papel como moduladora do sistema imune, sendo benéfica para o hospedeiro (Bagnaresi *et al.*, 2012). Santello e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com melatonina reduz a proliferação de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção, otimizando a resposta imune hospedeira através da produção de interleucinas e leucócitos.

Cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* tem a produção de mediadores inflamatórios aumentada, o que pode gerar potente resposta imune e consequente resposta inflamatória que contribui para o aparecimento de danos ao tecido cardíaco (Teixeira *et al.*, 2002). O tratamento com melatonina de cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* reduziu o processo inflamatório através da regulação negativa da inflamação, levando a diminuição dos focos inflamatórios no tecido cardíaco durante cardiomiopatia chagásica crônica (Oliveira *et al.*, 2013).

Foi descrito que o zinco atua de forma essencial para o funcionamento eficaz do sistema imune em humanos e animais, indicando que níveis reduzidos desse elemento no organismo podem causar deficiência imunitária, beneficiando o desenvolvimento de patógenos causadores de infecções (Shankar & Prasad, 1998). Brazão e colaboradores (2011) demonstraram que a administração de zinco combinado a melatonina neutraliza os efeitos negativos na imunidade do hospedeiro induzido pelo parasito durante a infecção. Outros experimentos

conduzidos através da administração concomitante de zinco e melatonina demonstraram que o tratamento reduziu a contagem de linfócitos T, responsáveis pela formação de lesões no tecido cardíaco (Brazão *et al.*, 2014).

2.6.2. Malária e melatonina

Estima-se que em 2018 cerca de 228 milhões de casos de malária ocorreram pelo mundo, com grande parte se desenvolvendo em regiões da África (World Malaria Report, 2019). A forma mais virulenta da doença é causada pelo *Plasmodium (P.) falciparum* e pode ser fatal em um curto período, sendo a principal causa de morte de crianças com menos de 5 anos na Zâmbia, no sul da África (Bagnaresi *et al.*, 2012).

A principal característica da doença são os picos de febre que ocorrem em intervalos sincronizados múltiplos de 24 h, indicando que o processo de ruptura e reinvasão de hemácias pelo *Plasmodium* spp. ocorre de forma extremamente sincronizada e os fotoperíodos atuam de forma direta nesse mecanismo, sendo essencial para a sobrevivência e desenvolvimento do parasito no hospedeiro (Taliaferro & Taliaferro, 1934; Bagnaresi *et al.*, 2009).

Hotta e colaboradores (2000) descreveram que a melatonina altera o desenvolvimento do parasito quando há a retirada da glândula pineal, levando a alterações na sincronização no ciclo de invasão. Concentrações adequadas de cálcio presentes no parasito modulam benéficamente a sincronização do parasito intracelular. Melatonina causa a liberação de cálcio através da ativação de receptores e mensageiros específicos, levando a dessincronização do parasito e de seu ciclo intraeritrocítico, indicando que alterações no ciclo circadiano podem alterar diretamente o desenvolvimento do *Plasmodium* spp. no hospedeiro (Hotta *et al.*, 2000, Daryani *et al.*, 2018).

Estudos sugerem que a melatonina é capaz de reduzir a apoptose de hepatócitos durante infecção por *P. yoelii* em camundongos e apresenta efeito hepatoprotetor através da inibição da via mitocondrial precursora da apoptose através da ativação da cascata de sinalização dependente de caspases. O tratamento com melatonina reduz a abertura de poros de transição de permeabilidade na mitocôndria e com isso impede a apoptose dos hepatócitos (Guha *et al.*, 2007).

2.6.3. Leishmaniose e melatonina

As leishmanioses são endêmicas em mais de 98 países, incluindo áreas dos trópicos, subtropicais e Mediterrâneo, com um total aproximado de 350 milhões de pessoas em risco de contágio e 12 milhões de casos confirmados de infecção. Apenas na bacia do Mediterrâneo a leishmaniose canina acomete cerca de 2,5 milhões de cães (Akhoundi *et al.*, 2016).

O tratamento de primeira linha para leishmaniose se baseia na administração de antimoniais pentavalentes, porém, há casos de aumento de resistência ao tratamento e presença de efeitos colaterais graves. O tratamento secundário dá-se pela utilização de anfotericina B, no entanto, sua utilização está associada a efeitos colaterais adversos (Mbongo *et al.*, 1998). Em casos de leishmaniose visceral a miltefosina é o tratamento de primeira linha utilizado, mas pode causar reações adversas, além de ter efeito teratogênico (Sundar *et al.*, 2012).

Elmahallawy e colaboradores (2014) descreveram que o tratamento com melatonina exógena reduz o número de promastigotas de *L. infantum* através da alteração de parâmetros mitocondriais essenciais para a sobrevivência do parasito. Tais efeitos estão relacionados com a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial após o tratamento, levando ao colapso do complexo de cadeia respiratória mitocondrial e a eliminação do parasito (Elmahallawy *et al.*, 2014). Em casos de infecção de hamsters por *L. amazonensis*, o ritmo circadiano controlado pela melatonina demonstrou atenuar a infectividade dos parasitos quando inoculados durante a noite. Melatonina também reduziu a proliferação dos parasitos e o desenvolvimento de lesões na pata dos animais que foram infectados no mesmo período (Laranjeira-Silva *et al.*, 2015).

2.6.4. Amebíase e melatonina

Entamoeba histolytica é protozoário extracelular causador de infecção intestinal chamada amebíase e que se estima afetar cerca de 50 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, especialmente em áreas de baixas condições socioeconômicas (Norman *et al.*, 2020). Em condições normais o hospedeiro permanece com a infecção e o parasito se mantém sem causar sintomas no organismo. No entanto, o parasito pode levar o hospedeiro a

desenvolver sintomas que caracterizam a amebíase intestinal e possui diferentes graus de severidade (Carrero *et al.*, 2020). Pacientes com infecção por *E. histolytica* geralmente não desenvolvem sintomas, porém, cerca de 4-10% podem apresentar sintomas que englobam cólicas, dor abdominal, diarreia com ausência ou presença de sangue e perda de peso (Stanley, 2003; Kantor *et al.*, 2018).

França-Botelho e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com melatonina reduz significativamente áreas com necrose hepática causadas pela infecção *in vivo* de hamsters por *E. histolytica*. Em outros experimentos do mesmo estudo foi demonstrado que o tratamento com melatonina atua de forma benéfica na imunidade dos hamsters através do aumento da atividade de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares (França-Botelho *et al.*, 2011).

2.6.5. *Toxoplasma gondii* e melatonina

A imunidade mediada por células é o principal mecanismo de controle para toxoplasmose através de resposta mediada por linfócitos T (Daryani *et al.*, 2018). Mocchegiani e colaboradores (1994) descreveram o papel da melatonina na restauração da imunidade mediada por zinco que possui função importante no funcionamento eficaz da resposta imune mediada por células T.

A administração isolada ou sinérgica de zinco e melatonina é capaz de elevar a produção de linfócitos T em ratos durante infecção pelo *T. gondii*, ativando resposta imune celular essencial no combate ao parasito (Baltaci *et al.*, 2003). Baltaci e colaboradores (2004) descreveram que melatonina e zinco regulam a produção de NO durante infecção pelo *T. gondii*. A deficiência em melatonina causa o aumento nos níveis de NO plasmático, enquanto a redução nos níveis de zinco inibe essa produção, indicando interação direta entre o zinco e a produção de NO. Estudos posteriores descrevem a relação direta entre melatonina, zinco e o bom funcionamento da resposta imune mediada por células. A redução ou ausência de uma dessas moléculas afeta diretamente a produção de células T, bem como os níveis reduzidos de melatonina induzem a redução dos níveis de zinco no organismo, indicando a relação estreita e conjunta dessas moléculas para resposta imune eficaz contra *T. gondii* (Baltaci *et al.*, 2005).

2.7. Mecanismos de morte celular

Ao longo do processo de proliferação, as células em excesso são eliminadas seletivamente para dar a forma adequada a órgãos, tecidos e partes do corpo durante toda a vida. Esse mecanismo de controle de células, em condições normais, é equilibrado, recebendo o nome de “homeostase celular” (Henriquez *et al.*, 2008). A morte celular regulada pode ser classificada em passiva, que ocorre quando a célula é submetida a algum tipo de estresse, ou ativa, quando a própria célula provoca sua eliminação (Tait *et al.*, 2014).

Existem três tipos principais de morte celular: apoptose, necrose e autofagia. O critério de diferenciação entre esses tipos de morte é a morfologia da célula durante o processo. Autofagia e apoptose têm suas características bem descritas, enquanto a necrose apresenta características opostas aos outros dois tipos (Henriquez *et al.*, 2008).

2.7.1. Apoptose

O termo “apoptose” foi atribuído por Kerr e colaboradores (1972) quando analisaram comparativamente a necrose com a até então chamada “necrose por contração por motivos morfológicos”, posteriormente apoptose, e observaram a exclusão controlada de células, aparecendo espontaneamente ou por mecanismos fisiológicos. Além de papel homeostático, a apoptose pode ocorrer como mecanismo de defesa em reações imunológicas ou por danos a célula causados por agentes nocivos, como radiação utilizada durante tratamento contra células tumorais (Elmore, 2007).

A apoptose (Figura 14) é reconhecida como mecanismo de eliminação de células altamente conservado que possui mecanismos de identificação específicos para as células que passarão por esse tipo de morte, como critérios morfológicos e exposição de fosfatidilserina em sua membrana (Henriquez *et al.*, 2008). As células exibem diversas modificações bioquímicas durante o processo, como clivagem de proteínas, fragmentação do DNA e reconhecimento dos corpos apoptóticos por células vizinhas ou macrófagos que as fagocitam, inibindo possível resposta inflamatória (Elmore, 2007).

O processo de apoptose ocorre dentro dos limites da membrana plasmática da célula e causa a fragmentação nuclear e citoplasmática de forma ordenada, com a formação de corpos apoptóticos que serão degradados ao final

do processo de fagocitose (Lawry, 2004; Vicencio, 2008). Caso não ocorra a fagocitose, os restos celulares podem entrar em um processo de necrose secundária, no entanto, mesmo durante este processo podem continuar inibindo resposta inflamatória (Tait *et al.*, 2004).

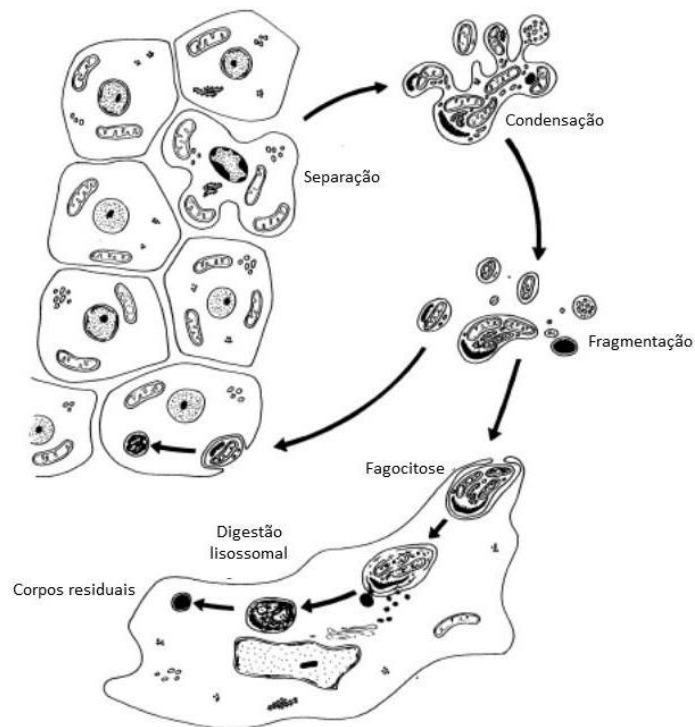


Figura 14. Ilustração das etapas que estão envolvidas no processo de morte celular programada (apoptose). A apoptose se inicia com a separação da célula apoptótica do tecido, seguido de condensação do seu conteúdo (núcleo e citoplasma), produção de corpos apoptóticos que serão fagocitados e digeridos por lisossomos, com formação de corpos residuais ao final do processo (Traduzido de Kerr *et al.*, 1972).

2.7.2. Necrose

A necrose é um tipo de morte celular considerada radicalmente diferente da apoptose em quase todos os aspectos por ser considerada caótica em termos de organização e degradação celular (Syntichaky & Tavernarakis, 2002). Foi considerada durante anos como um mecanismo acidental de morte celular, como consequência de um trauma físico ou químico que causa danos irreparáveis a célula (Henriquez *et al.*, 2008).

Ao se comparar necrose e apoptose (Figura 15) pode-se dizer que a principal diferença é o nível organizacional do mecanismo de morte celular. A apoptose ocorre do núcleo para o citoplasma, de forma organizada, enquanto a

necrose tem sentido inverso, se iniciando com o colapso da membrana plasmática e consequente lise da célula (Proskuryakov *et al.*, 2003).

Este mecanismo de morte celular é considerado passivo, pois requer pouco gasto energético e não há necessidade da produção de proteínas que participem do processo, além de não regular fatores de homeostase (Syntichaky & Tavernarakis, 2002).

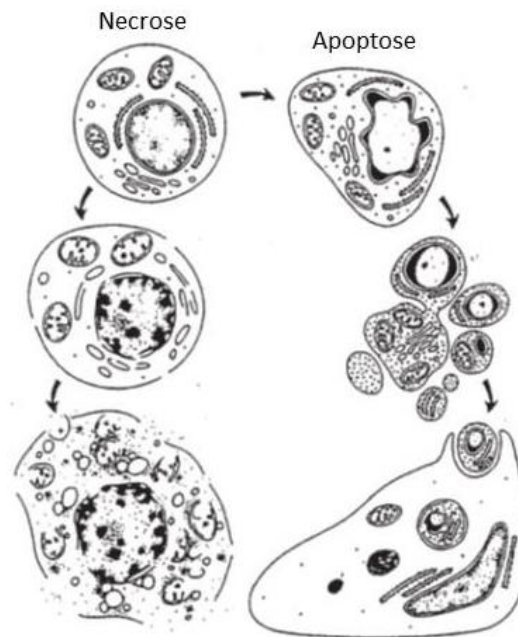


Figura 15. Diagrama ilustrativo com as diferenças entre necrose e apoptose. A necrose (esquerda) se inicia com o rompimento da membrana celular e a liberação do conteúdo citoplasmático, com aparecimento de inflamação. Na apoptose (direita) há a condensação do conteúdo citoplasmático, formação e degradação de corpos apoptóticos de forma orquestrada, sem iniciar processo inflamatório (Traduzido de Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

2.7.3. Autofagia

A autofagia (Figura 16) é um processo de degradação celular a partir da entrega de material celular aos lisossomos para que seja degradado (Parzych & Klionsky, 2014). Os lisossomos digerem o material celular e os restos podem ser aproveitados para formarem novos componentes e estruturas celulares ou podem, ainda, serem utilizados como fonte de energia para a célula em casos de privação de nutrientes (Henriquez *et al.*, 2008; D'Arcy, 2019). A autofagia pode ocorrer a partir de estresses como privação de nutrientes para a célula, embriogênese e pode também atuar no mecanismo de destruição de patógenos, funcionando como transporte para esses antígenos que serão possivelmente

degradados por ação da imunidade inata ou adaptativa (D'Arcy, 2019). A reciclagem de conteúdo celular mediado pelo processo de autofagia envolve, por exemplo, a manutenção do equilíbrio proteico das células, a fim de manter sua renovação, adaptação e sobrevivência em condições adversas nos quais a célula pode ser submetida (Ravanan *et al.*, 2017).

O processo de autofagia se inicia com a formação de uma membrana de isolamento, chamada fagóforo, derivada da bicamada lipídica do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. O fagóforo se expande para englobar as moléculas intracelulares que serão transportadas, formando um autofagossomo. Este autofagossomo se funde com o lisossomo e causa a degradação de seu conteúdo pelas enzimas do lisossomo. Transportadores lisossômicos exportam os produtos gerados pela degradação para o citoplasma, onde podem ser aproveitados na produção de novas moléculas ou no metabolismo energético da célula (Glick *et al.*, 2010).

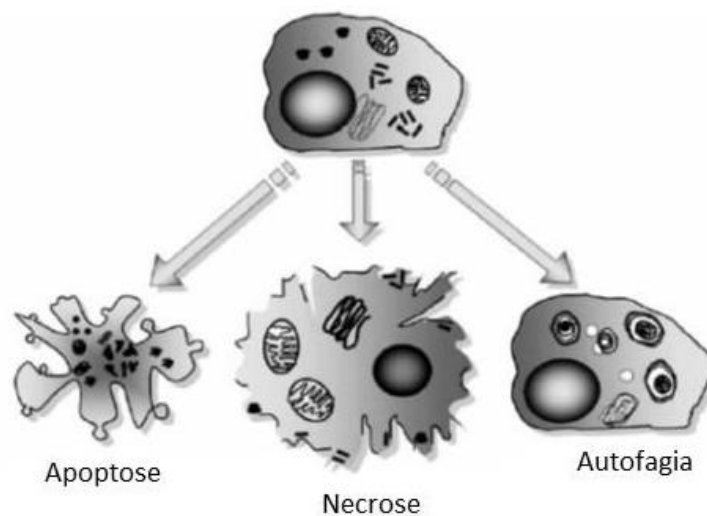


Figura 16. Esquema representando os três principais tipos de morte celular: apoptose, necrose e autofagia. Durante a apoptose ocorre condensação da membrana plasmática e do conteúdo intracelular. A necrose ocorre com a ruptura da membrana plasmática e extravasamento do citoplasma. Autofagia é processo de transporte e reciclagem de conteúdo celular para manter seu correto funcionamento (Traduzido de Henriquez *et al.*, 2008).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Verificar a ação anti-*Toxoplasma* de melatonina após tratamento de células LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii*.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a eficácia do tratamento com melatonina na infecção *in vitro* por *T. gondii* através de visualização por microscopia óptica;
- Verificar aspectos morfológicos e estruturais de *T. gondii* após tratamento com melatonina após análise por microscopias eletrônicas de varredura e transmissão;
- Verificar o possível tipo de morte celular de *T. gondii* após o tratamento com melatonina e análise por microscopia de fluorescência.

**Manuscrito submetido para Parasitology Research, em 20 de
fevereiro de 2020**

Nayara Inocencio Machado^{a,b}, Thiago Alves Teixeira dos Santos^{a,b#},

Wanderley de Souza^c, Renato Augusto DaMatta^a, Sergio Henrique Seabra^{a,b}

^aUniversidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ

^bCentro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ

^cUniversidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

#Centro Universitário IBMR, Rio de Janeiro, RJ

Nayara Inocencio Machado^{a,b}, Thiago Alves Teixeira dos Santos^{a,b,#}, Wanderley de Souza^c; Renato Augusto DaMatta^{b*}; Sergio Henrique Seabra^{a,b*}

Treatment with melatonin induces a reduction of *Toxoplasma gondii* development in LLC-MK2 cells

^a Laboratório de Tecnologia em Cultura de Células, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 23070-200, Brazil

^b Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Bociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP: 28013-602, Brazil

^c Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem and Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21941-170, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 22 2739 7310

renato@uenf.br

seabrash@gmail.com

Present Adress: Centro Universitário IBMR, Avenida das Américas, 2603, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 22631-002, Brazil

Declarations

Funding

The authors are grateful for the financial support provided by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Finance Code 001) and FAPERJ (Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval

This study was approved by the Ethics commission of *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro* (Protocol 318).

Consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

Not applicable.

Code availability

Not applicable.

Authors' contributions

NIM, TATS performed the experiments. WS, RAD, SHS were responsible for funding acquisition and interpretation of the results. SHS, RAD designed the experiments. NIM wrote the manuscript and all authors critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Abstract:

It is known that the current treatment for toxoplasmosis causes side effects. Thus, it is essential to develop new therapies with reduced adverse effects while concurrently maintaining broad coverage and prophylactic therapy. Melatonin is a hormone that participates in the circadian cycle in vertebrates and has antioxidant, immunomodulatory, and antitumoral functions. In addition, it has been shown that melatonin can modulate immune responses and parasitic development during infection by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Furthermore, studies indicate that melatonin increases the number of lymphocytes in rats infected by *Toxoplasma gondii*. However, there is no information on the possible effects of melatonin in *T. gondii*-infected host cells *in vitro*. This study analyzed the effects of melatonin treatment in the monkey kidney cell epithelial cell line, LLC-MK2, after infection with *T. gondii*. LLC-MK2 cells were infected, treated/not treated with melatonin, and the infection index was then quantified. Melatonin treatment did not alter host cell viability and was able to reduce parasite proliferation in LLC-MK2 cells at 24 and 48 h and at six days. Analysis by scanning electron microscopy confirmed reduction of parasite proliferation and alterations of tachyzoite shapes. Transmission electron microscopy images showed parasites with ruptured plasma membranes and cytoplasmic leakage. After treatment, parasites showed positive staining for apoptotic cell death. These results suggest that the use of melatonin as the lead compound for the synthesis of new compounds may constitute an alternative treatment for toxoplasmosis.

Keywords: Antiproliferative activity; Chemotherapy; Melatonin; *Toxoplasma gondii*.

1. Introduction

Toxoplasmosis is an infection caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan parasite that is distributed worldwide and affects about one third of the world's population (Tenter et al. 2000; Dubey et al. 2012). However, most infections are asymptomatic although can lead to severe manifestations in immunocompromised individuals, such as those with acquired immunodeficiency syndrome, or in those who have received organ transplants (Tenter et al. 2000). In addition, some *T. gondii* strains can cause severe toxoplasmosis in immunocompetent patients (Demar et al. 2012). Infections acquired by women during pregnancy can also cause serious problems for the fetus (Dunn et al. 1999). It is estimated that about 90% of domestic and wild animals in Brazil have antibodies against *T. gondii* (Dubey et al. 2012). Epidemiological data from Brazil indicate that 50% of children and 80% of women of childbearing age have antibodies against this parasite (Dubey et al. 2012). The most common form of toxoplasmosis acquisition is through *T. gondii*-contaminated water and/or undercooked or raw food, such as meat and vegetables (Tenter et al. 2000). Chronic infection can be reactivated if there is suppression of the host immune system, and lead to toxoplasmic encephalitis, myocarditis, and/or lung inflammation (Liu et al. 2015).

Treatment for toxoplasmosis varies according to the type and severity of the infection (Jones et al. 2014). The combination of pyrimethamine and sulfadiazine is recommended for prophylaxis and treatment of the disease (Montazeri et al. 2018), but the combination is toxic and leads to treatment discontinuation in most cases (Djurković-Djaković et al. 1999). For pregnant women and immunocompromised patients, the use of sulfadiazine and pyrimethamine is not recommended because it generates serious side effects (Dunay et al. 2018), such as leukopenia and hepatic necrosis (McLeod et al. 2006; Montazeri et al. 2018). Therefore, it is important to develop new drugs with fewer side effects and wide prophylactic and therapeutic coverage.

Melatonin is a highly conserved molecule found in almost all species of vertebrates, regulates their Circadian cycles (Bagnaresi et al. 2012), and has antioxidant properties in addition to antitumor and immunomodulatory roles (Vielma et al. 2014). It has been shown that melatonin is capable of modulating the immune response of the vertebrate host during infection with *T. gondii* (Baltaci

et al. 2003, 2004, 2005), *Plasmodium* spp. (Bagnaresi et al. 2012), *Trypanosoma cruzi* (Brazão et al. 2014), and *Leishmania* spp. (Elmahallawy et al. 2014; Laranjeira-Silva et al. 2015). Bagnaresi et al. (2012) reported that melatonin can modulate the cell cycle of *Plasmodium* spp. and consequently, their development. Recent studies indicate that melatonin is efficacious as a possible chemotherapeutic drug in cases of cardiomyopathy resulting from chronic infection caused by *T. cruzi* infection (Brazão et al. 2014). Elmahallawy et al. (2014) demonstrated the *in vitro* activity exerted by melatonin on *Leishmania infantum* promastigotes. In addition, Laranjeira-Silva et al. (2015) described that melatonin is capable of attenuating *L. amazonensis* in *in vivo* infections in hamsters and *in vitro* in macrophages through arginine metabolism. The administration of zinc, melatonin, or zinc conjugated to melatonin in rats infected with *T. gondii* caused a significant increase in the number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, thus ensuring the correct functioning of this defense mechanism against this parasite (Baltaci et al. 2003, 2004, 2005). As far as we know, there are no studies concerning the direct effects of melatonin on *T. gondii* development after *in vitro* infection of host cells.

In this study, LLC-MK2 cells infected with *T. gondii* were treated with several different melatonin concentrations. Parasite growth, morphology, and ultrastructure were analyzed. In addition, apoptotic cell death was assayed in melatonin-treated parasites. It was shown that treatment with melatonin was effective against intracellular *T. gondii* and may itself or via a new derivative compound constitute an alternative for toxoplasmosis treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance of LLC-MK2 cells

The epithelial cell line LLC-MK2 (Rhesus monkey, kidney) was maintained in 25 cm² flasks for cell cultures (SPL Life Sciences, Korea) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Difco, USA) in an incubator at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. Confluent LLC-MK2 cells were detached with a trypsin-versene solution, counted, and 1 x 10⁵ cells per well were seeded in a 24-well plate containing sterile coverslips (SPL Life Sciences, Korea). Cells were cultured for 48 h before interaction with parasites.

2.2. Parasites and LLC-MK2 cell infection

Tachyzoites of *T. gondii* (RH strain) were maintained in the peritoneal cavity of mice for 2 to 3 days. Animal studies were approved by the State University of Norte Fluminense (UENF) Ethics Committee (protocol 318). Peritoneal cavities of mice were washed using phosphate buffered saline (PBS), and the solution containing *T. gondii* tachyzoites was centrifuged for 10 min at 500 x g. The pellet was resuspended in 1 ml of DMEM, and parasites were quantified in a Neubauer chamber. Parasites (1 x 10⁶ per well) were added to LLC-MK2 cells cultured on coverslips for 1 h, cells were washed with PBS and DMEM supplemented with 10% FBS with or without melatonin, and further cultured.

2.3. Melatonin

Melatonin (Sigma Aldrich, USA) was diluted in DMEM at a concentration of 3 mM and sterile filtered (0.22 µm). After 1 h of parasite infection and cell washing, some wells containing cells over coverslips received 500 µl of DMEM with 3mM of melatonin and 10% FBS. Control cells received only DMEM with FBS and no melatonin. Different melatonin concentrations were used to obtain half of the maximum inhibitory concentration (IC₅₀). Infected melatonin-treated and control cells were cultured for 24 or 48 h or six days. After the specified time, melatonin-treated and non-treated cells were washed with PBS and fixed with 4% freshly prepared formaldehyde in PBS. To examine possible reversibility of melatonin on *T. gondii* growth, melatonin was withdrawal from another set of cells

after the treatment time specified above. After treatment, cells were washed with PBS and DMEM with FBS without melatonin, further cultured for 96 h, and then fixed as described above.

2.4. Cell viability assay

The effect of melatonin on host cell viability was evaluated by quantification of the reduction of the 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide salt ([MTT]; Sigma Aldrich, USA) to formazan in viable cells. LLC-MK2 cells were plated and treated with 0.75, 1.5, or 3mM of melatonin for 24 or 48 h or six days. Control cells were maintained with DMEM supplemented with 10% FBS. Negative controls consisted of addition of 10% Triton X-100 to cells. After 24 or 48 h or six days of treatment, culture medium was removed, 5 mg/ml of MTT in DMEM was added to the wells for 4 h, formazan was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO), and absorbance read at 570 nm (Portes et al. 2018).

2.5. Light microscopy and infection index

Fixed cells were washed with PBS, stained with 10% Giemsa solution in water, and dehydrated in acetone/xylol solutions. Cells on coverslips were mounted on slides over Entellan and observed under a light microscope. Parasite development was evaluated by counting infected and non-infected LLC-MK2 cells and tachyzoites number per infected cell. At least 300 cells per coverslips were counted. Each time point was evaluated in triplicate, and independent experiments were repeated at least three times. The infection index was obtained by multiplying the percentage of infected LLC-MK2 cells by the mean number of parasites per infected cell. The IC₅₀ of melatonin was determined by plotting different melatonin concentrations versus infection index and calculating a non-linear regression curve using GraphPad Prism 5.0 software.

2.6. TUNEL assay

Infected cells with or without melatonin were washed with PBS and fixed for 1 h with 4% freshly prepared formaldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 20 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, and 70 mM KCl, pH 7.2). Cells were washed, permeabilized in cold ethanol for 10 min, and processed as

recommended by the Alexa-Fluor 488 Click-it terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) Kit (Molecular Probes, USA). Cells were visualized under a Zeiss Confocal Laser Microscope LSM-710.

2.7. Scanning electron microscopy analysis

Coverslips containing *T. gondii*-infected LLC-MK2 cells with/without melatonin were fixed for 1 h in 4% freshly prepared formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4. The cells were post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide in 0.1 M of sodium cacodylate buffer. Cells were dehydrated in acetone, critical point (CO₂) dried, and mounted on stubs. The upper cell layer was removed with adhesive tape to reveal the internal organization and parasites within parasitophorous vacuoles (Flood, 1975). The samples were gold-coated (25 nm) and analyzed under a JEOL 6490 JSM LQ scanning electron microscope.

2.8. Transmission electron microscopy analysis

Cells were infected and treated with melatonin on 25 cm² culture flasks. At the end of the experiment, cells were washed and fixed as described for scanning electron microscopy. Cells were removed from the flasks via cell scraping, transferred to tubes, washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer for 40 min, and protected from light. Cells were washed, dehydrated in acetone, and embedded in epoxy resin. The resin was polymerized for 48 h in a 60°C incubator. Ultrathin sections were prepared and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for visualization under a FEI Spirit 120kv transmission electron microscope.

2.9. Data analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for at least three experiments in triplicate and analyzed statistically using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons post-test. $P < 0.05$ indicated significance.

3. Results

Melatonin treatment did not cause any significant alterations in LLC-MK2 cell viability; reduced viability tendency was detected when high melatonin concentrations were used for 48 h and six days (Figure 1).

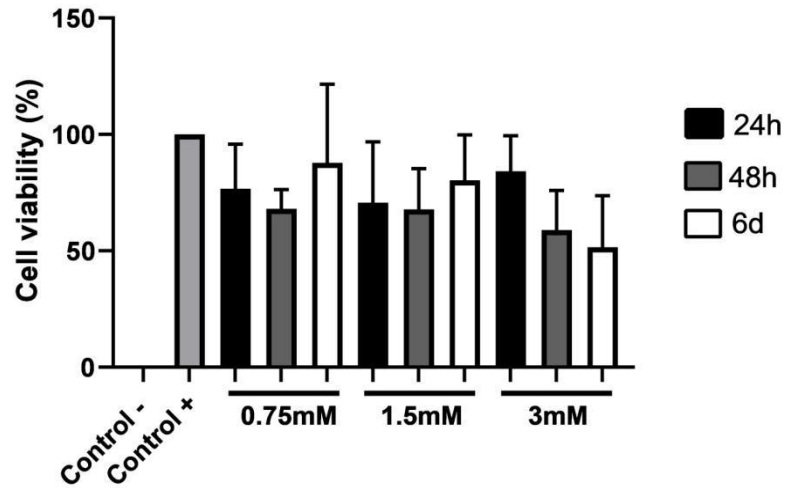


Fig. 1 Cell viability of LLC-MK2 cells after melatonin treatment. Cells were cultured and treated with 0.75, 1.5, and 3mM of melatonin for 24 or 48 h or six days. After treatment cell viability was measured by the 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide salt (MTT) assay.

Control LLC-MK2 cells showed an increase in parasite growth in a time-dependent manner (Figure 2). Melatonin-treated cells presented a reduction in infection index when compared to untreated cells (Figure 2). After six days of treatment with melatonin, host cells showed an expressive reduction in parasite growth (Figure 2). Removal of melatonin after 24 h incubation caused a reversal of the inhibitory effects (Figure 2), but parasites that were treated with melatonin for 48 h and six days were not capable of growing after melatonin withdrawal (Figure 2). The IC₅₀ for *T. gondii* after treatment with melatonin was 3mM at 24 h, 1.69mM at 48 h, and 1.13mM at six days.

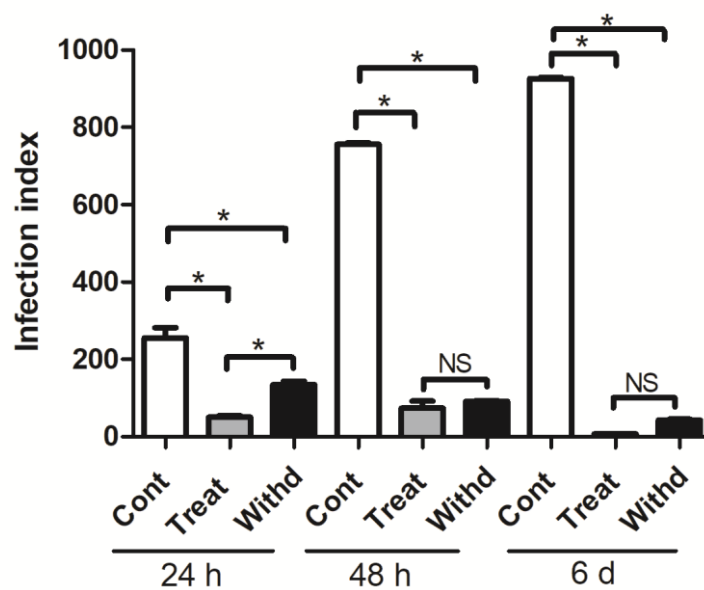


Fig. 2 Infection index of *Toxoplasma gondii* in LLC-MK2 cells. Cells were infected, treated (*Treat*) or not (*Cont*) with melatonin (3mM) and cultured for 24 or 48 h or six days. For the reversibility assays, melatonin was withdrawn (*Withd*) and cells cultured for an extra 96 h. *Significantly different by the one-way analysis of variance ($P < 0.05$)

Light microscopy images demonstrated reduction of parasite growth after melatonin treatment (Figure 3). Untreated cells after 24 h, 48 h, and six days (Figure 3a, b, c) post-infection with *T. gondii* showed expected parasite proliferation with rosettes at 24 h (Figure 3a), rosettes with many parasites at 48 h (Figure 3b) and ruptured LLC-MK2 cells and parasite release after six days of infection (Figure 3c). Cells treated with melatonin after *T. gondii* infection showed a reduction of parasite proliferation at 24 h (Figure 3d), 48 h (Figure 3e) and after six days (Figure 3f). These images also show that melatonin treatment caused preservation of the host cell structure (Figure 3d-f). Parasites, which were treated for 24 h after which time melatonin was removed, were capable of growing (Figure 3g) but lost the capability of organizing into a rosacea. In addition, cells that were treated for 48 h (Figure 3h) and six days (Figure 3i) and further cultured after melatonin withdrawal showed many vesicles but no structures resembling parasites.

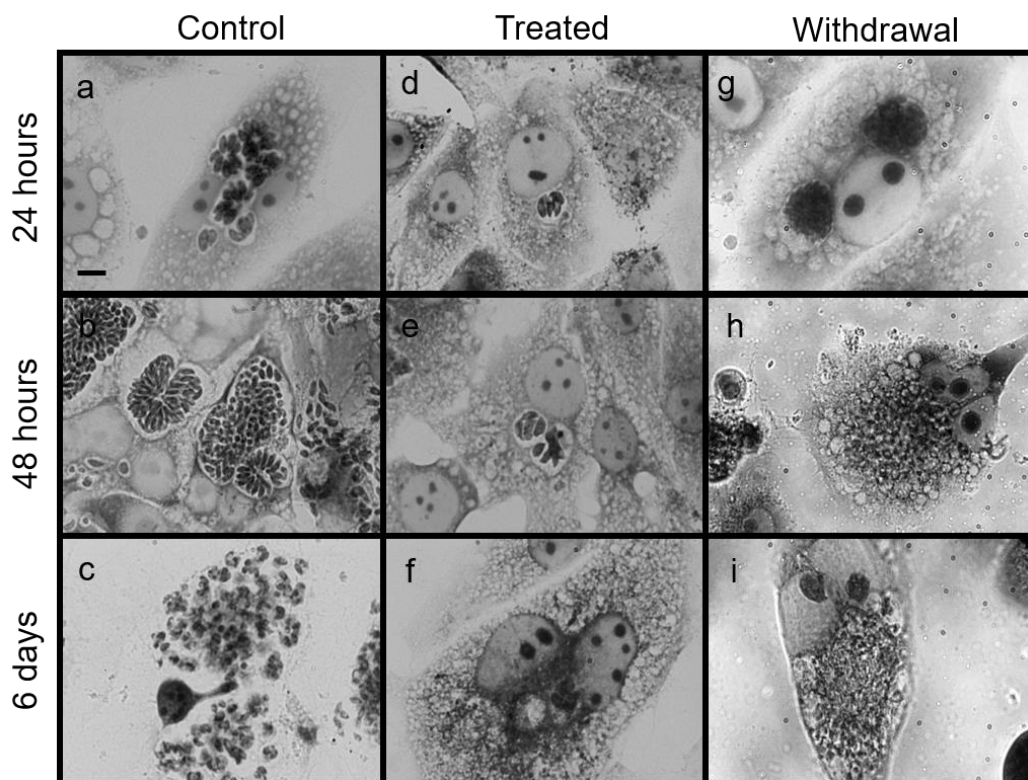


Fig. 3 Bright-field light microscopy images of LLC-MK2 cells infected with *Toxoplasma gondii*. Cells were treated with melatonin (3mM) or left untreated, or melatonin was withdrawn, and cells further cultured for 96 h. Cells without melatonin treatment (*Control*), after 24 h (a), 48 h (b), and six days (c) of infection. Cells treated with melatonin (*Treated*) after 24 h (d), 48 h (e) and six days (f) of infection. Cells treated with melatonin for 24 h (g), 48 h (h) and six days (i) of infection, washed, and cultured without melatonin (*Withdrawal*) for an extra 96 h. Note the absence of rosettes in the 24 h melatonin withdrawn (g). Bar = 20 μ m

Scanning electron microscopy images showed *T. gondii* proliferation in untreated cells after 48 h (Figure 4a) and rupture of cells and release of parasites after six days of infection (Figure 4b). After 48 h of infection and melatonin treatment, a reduction in the number of parasites was observed inside host cells. These parasites did not form typical rosettes (Figure 4c). After six days of infection and treatment, few parasites were observed inside host cells, which were well-preserved (Figure 4d).

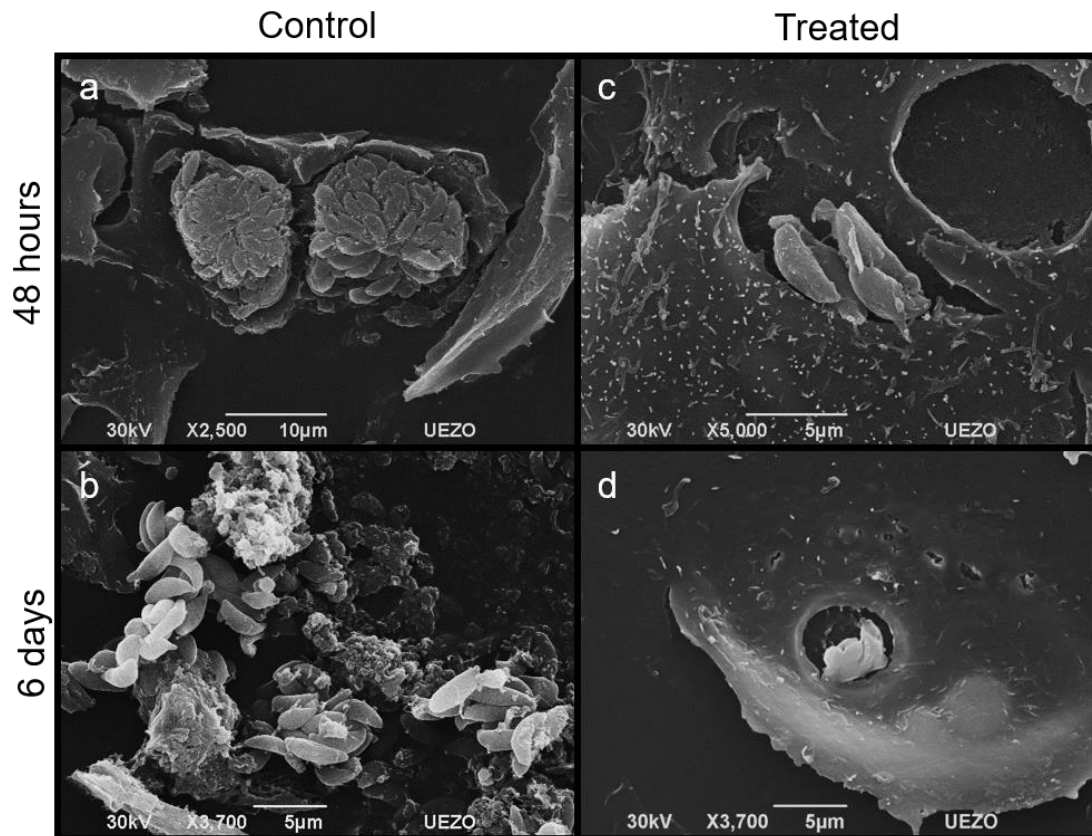


Fig. 4 Scanning electron microscopy images of *Toxoplasma gondii*-infected LLC-MK2 cells with or without melatonin (3mM). Host cells after 48 h (a) and six days (b) of *T. gondii* infection without melatonin treatment (*Control*). Host cells infected by *T. gondii* after 48 h (c) and six days (d) of melatonin treatment (*Treated*).

Analysis by transmission electron microscopy (Figure 5) showed that 24 h, 48 h, and six days post-infection in untreated cells, the ultrastructure of the parasite did not change, and parasites normally divided (Figure 5a-c). In infected cells treated for 24 h, vacuoles were seen inside the parasite, and myelin-like structures within the parasitophorous vacuole were also observed (Figure 5d). After 48 h of melatonin treatment, intracellular structures similar to degraded parasites were also observed (Figure 5e). After six days of treatment, there was rupture of the parasitic plasma membrane and extravasation of the cytoplasm in addition to other parasites with vacuoles and myelin-like structures (Figure 5f).

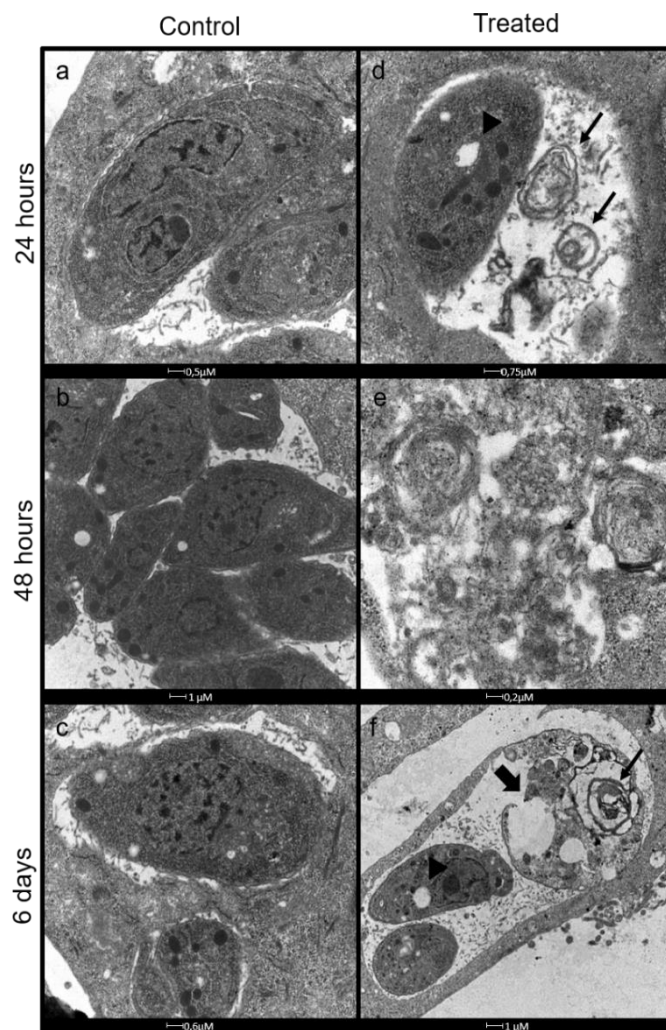


Fig. 5 Transmission electron microscopy images of *Toxoplasma gondii* infected LLC-MK2 cells, with or without melatonin (3mM). Intracellular parasites in host cell without melatonin (*Control*) after 24 h (a). After 24 h of treatment (*Treated*), parasite presented vacuoles (*arrowhead*), and myelin-like structures were seen in the parasitophorous vacuole (*arrows*) (d). Intracellular parasites without treatment (*Control*) after 48 h (b). Intracellular structures similar to degraded parasites after 48 h of treatment (*Treated*) (e). Parasites without treatment (*Control*) after six days (c). Parasites presented vacuoles (*arrowhead*), ruptured parasite (*large arrow*) and myelin-like structures (*arrow*) after six days of treatment (*Treated*) (f).

The TUNEL assay was performed to evaluate whether apoptotic mechanisms were involved in *T. gondii* cell death inside LLC-MK2 cells after melatonin treatment. Laser confocal microscopy images confirmed apoptosis-related deaths of some of the parasites (Figure 6).

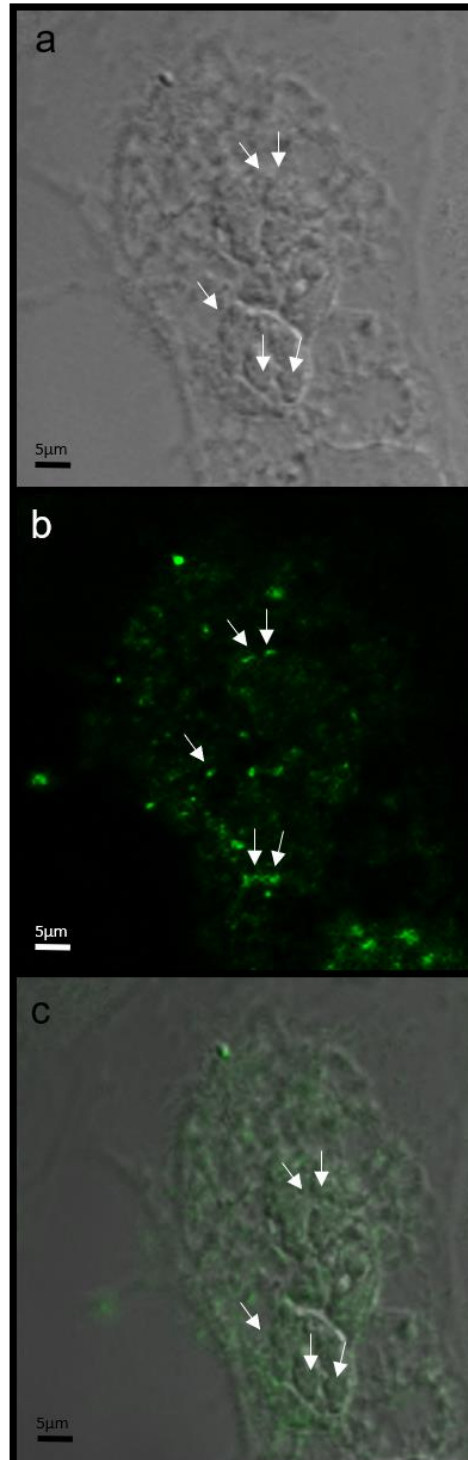


Fig. 6 Differential interference contrast (DIC) and fluorescence images after the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay of *Toxoplasma gondii*-infected LLC-MK2 cells treated with melatonin (3mM). DIC of cells infected with *T. gondii* (a). Fluorescence image of parasites positively labeled for DNA fragmentation (arrows) (b). DIC and TUNEL merge images (c). Bar = 5µm

4. Discussion

Toxoplasma gondii is the etiological agent of toxoplasmosis (Dubey et al. 2012). Treatment of this disease is based on administration of drugs that cause serious side effects in people (Djurković-Djaković et al. 1999). Therefore, development of new drugs with fewer side effects is essential. Melatonin was shown to be capable of controlling parasite development (Bagnaresi et al. 2012). Thus, the effect of melatonin treatment on *T. gondii* development in LLC-MK2 cells was analyzed in this study. Melatonin treatment induced a reduction in the development of *T. gondii* in LLC-MK2 cells, especially after six days of treatment. Ultrastructural analysis demonstrated alterations in parasite conformation and rupture of the parasitic plasma membrane after melatonin treatment. In addition, some parasites died by apoptotic cell death. These results suggest that melatonin may control *T. gondii* development.

Elmahallawy et al. (2014) described the capability of melatonin in reducing *in vitro* development of *L. infantum* resulting from the collapse of the parasitic mitochondrial respiratory chain, which is essential for parasite survival. Our study showed that melatonin treatment reduced *in vitro* growth of *T. gondii* in LLC-MK2 cells after 24 and 48 h and six days. Reduction in parasite development was most extensive after six days of treatment when compared to the control. Thus, melatonin may be acting on the metabolism of *T. gondii* and impeding its development. Parasites treated for only 24 h with subsequent removal of melatonin were still capable of growing. However, parasites treated for 48 h and six days were not capable of growing after melatonin withdrawn; in addition, these host cells presented many vacuoles probably due to parasite digestion. These results indicate that melatonin was capable of permanently inhibiting parasite growth at 48 h post-treatment.

Previous studies have described the capability of melatonin to reduce *L. amazonensis* development in macrophages through a mechanism dependent on its membrane receptors, thus preventing the parasite from penetrating the cells (Laranjeira-Silva et al. 2015). Elmahallawy et al. (2014) also described melatonin-induced alterations in homeostasis that led to parasite death. The infection index result demonstrated a reduction in the number of parasites that were capable of infecting cells and then remaining there. Drugs currently used for *T. gondii* treatment are ineffective for total elimination of the parasite from the host

organism (Dunay et al. 2018). These drugs are capable of eliminating only part of the parasites with some of the parasites undergoing conversion to bradyzoites in tissue cysts that persist for life in the host organism and may later be reactivated (Djurković-Djaković et al. 1999). We and others have previously demonstrated by scanning electron microscopy that *T. gondii* develops and forms rosettes in untreated host cells (da Silva et al. 2015; Portes et al. 2018). Scanning electron microscopy images showed that even after six days of melatonin treatment, there is no formation of tissue cysts. These data suggest that melatonin is capable of inhibiting parasitic growth, thus preventing conversion into bradyzoites and formation of tissue cysts.

Transmission electron microscopy images of *T. gondii*-infected LLC-MK2 cells that were treated with melatonin demonstrated that there is rupture of parasitic plasma membranes (in some of the parasites) and consequent extravasation of their cytoplasm, which is a characteristic of necrotic cell death. Other structures resembling necrotic parasites and myelin-like structures were also seen and suggest necrosis-induced parasitic cell death. In contrast, the TUNEL assay showed that some of the parasites appear to be dying as a result of apoptotic cell death. These results indicate that the parasite may die via different mechanisms after melatonin treatment. Previous data from Elmahallawy et al. (2014) suggest that melatonin-induced mitochondrial collapse leads to death via both necrosis and apoptosis. These studies corroborate our data and indicate that melatonin may be acting on the energy metabolism of *T. gondii*. Further studies are necessary to analyze this hypothesis.

In general, our study suggests that melatonin may constitute a lead molecule for the development of new compounds that are active against *T. gondii*. In addition, new studies will be performed in order to understand the mechanism of action of melatonin on *T. gondii*.

5. Conclusion

This study demonstrates that treatment with melatonin caused a significant inhibition of *T. gondii* growth in host cells *in vitro*. This hormone may be considered a lead molecule for the synthesis of other compounds to be tested against *T. gondii* and be a possible therapeutic aid in cases of *T. gondii* infection.

6. References

- Bagnaresi P, Nakabashi M, Thomas AP, Reiter RJ, Garcia CRS (2012) The role of melatonin in parasite biology. *Mol Biochem Parasitol* 181: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.010>
- Baltaci AK, Bediz CS, Mogulkoc R, Kurtoglu E, Pekel A (2003) Effect of zinc and melatonin supplementation on cellular immunity in rats with toxoplasmosis. *Biol Trace Elem Res* 96: 237–245. <https://doi.org/10.1385/BTER:96:1-3:237>
- Baltaci AK, Mogulkoc R, Turkoz Y, Bediz CS, Ozugurlu F (2004) The effect of pinealectomy and zinc deficiency on nitric oxide levels in rats with induced *Toxoplasma gondii* infection. *Swiss Med Wkly* 134: 359–363
- Baltaci AK, Mogulkoc R, Bediz CS, Pekel A (2005) Effects of zinc deficiency and pinealectomy on cellular immunity in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Biol Trace Elem Res* 104: 47–56
- Brazão V, Del Vecchio Filipin M, Caetano LC, Toldo MP, Caetano LN, do Prado Jr, JC. Trypanosoma cruzi: the effects of zinc supplementation during experimental infection. *Exp Parasitol* 2008; 118:549–54.
- Brazão V, Filipin MDV, Santello FH, Azevedo AP, Toldo MPA, de Moraes FR, do Prado JC (2014) Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease. *Immunobiology* 220: 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.11.018>
- da Silva LLR, Portes J de A, de Araújo MH, Sant'ana Silva JL, Rennó MN, Netto CD, da Silva AJM, Costa PRR, De Souza W, Seabra SH, DaMatta RA (2015) Further evidence that naphthoquinone inhibits *Toxoplasma gondii* growth *in vitro*. *Parasitol Int* 64: 622–631. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.08.010>
- Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, Bourbigot AM, Nasser V, Ajzenberg D, Darde ML, Carme B (2012) Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect* 18: E221–E231. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03648.x>
- Djurković-Djaković O, Nikolić T, Robert-Gangneux F, Bobić B, Nikolić A (1999) Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2240–2244
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL (2012) Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and

- epidemiology, Parasitology. 139: 1375-1424.
<https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>
- Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG (2018) Treatment of toxoplasmosis: historical perspective. *Animal Clin Microbiol Infect* 31: 1–33
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R (1999) Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353: 1829–1833. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)
- Elmahallawy EK, Jiménez-Aranda A, Martínez AS, Rodríguez-Granger J, Navarro-Alarcón M, Gutiérrez-Fernández J, Agil A (2014) Activity of melatonin against *Leishmania infantum* promastigotes by mitochondrial dependent pathway. *Chem Biol Interact* 220: 84–93.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.016>
- Jones JL, Parise ME, Fiore AE (2014) Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 90: 794–799.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0722>
- Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Floeter-Winter LM, Markus RP (2015) Melatonin attenuates *Leishmania (L.) amazonensis* infection by modulating arginine metabolism. *J Pineal Res* 59: 478–487.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12279>
- Liu Q, Wang Z, Huang S, Zhu X (2015) Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors* 1: 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>
- McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, Jalbrzikowski J, Remington J, Heydemann P, Noble AG, Mets M, Holfels E, Withers S, Latkany P, Meier P (2006) Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the national collaborative chicago-based, congenital toxoplasmosis study. *Clin Infect Dis* 42: 1383–1394. <https://doi.org/10.1086/501360>
- Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, Sarvi S, Tanzifi A, Aghayan SA; Daryani A (2009) Drug resistance in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Drug Resist.* 9: 1121–1126. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-595-8_31
- Portes J de A, Azeredo NFB, Siqueira PGT, de Souza TG, Fernandes C, Horn A, Candela DRS, de Souza W, DaMatta RA, Seabra SH (2018) A new iron(III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces

cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res 117: 2795–2805.
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5967-7>

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 30: 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

Vielma JR, Bonilla E, Chacín-bonilla L, Mora M, Medina-leendertz S, Bravo Y (2014) Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: A review. Acta Trop 137: 31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.021>

5. Discussão

Toxoplasmose é doença com grande significância na saúde pública, afetando a qualidade de vida das pessoas acometidas pela infecção (Aguirre *et al.*, 2019). É causada pelo parasito intracelular obrigatório *T. gondii* e afeta aproximadamente um terço da população mundial, com sua soro prevalência variando de acordo com a localização e condições socioeconômicas (Ben-Harari, 2017). A patogenicidade de *T. gondii* é um desafio para o desenvolvimento de novas terapias contra o parasito (Alday & Doggett, 2017). O tratamento de primeira linha recomendado é realizado através da utilização de sulfadiazina e pirimetamina (Ben-Harari, 2017) tendo como alvo os taquizoítos na fase aguda da infecção, porém, nenhum fármaco apresenta eficácia comprovada na eliminação do parasito durante o estágio latente da doença (Dunay *et al.*, 2018). O tratamento pode causar efeitos colaterais graves (Djurković-Djaković *et al.*, 1999), tornando-se essencial o desenvolvimento de novos fármacos anti-*Toxoplasma* e incluam terapia sistêmica efetiva que alcance todos os órgãos acometidos pela infecção (Alday & Doggett, 2017).

Melatonina, hormônio endógeno produzido pela glândula pineal, apresenta funções neuroimunomoduladoras que amplificam a atividade das células imunes (Calvo *et al.*, 2013), além de regular o importante processo do ritmo circadiano em organismos que vão desde arqueobactérias a vertebrados (Bagnaresi *et al.*, 2012). Melatonina mostrou ser eficiente em diversas infecções causadas por parasitos similares ao *T. gondii*, como *Plasmodium* spp. (Hotta *et al.*, 2000; Guha *et al.*, 2007; Daryani *et al.*, 2018), *T. cruzi* (Santello *et al.*, 2008; Bagnaresi *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013) e *Leishmania* spp. (Elmahallawy *et al.*, 2014; Laranjeira-Silva *et al.*, 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível ação anti-*Toxoplasma* da melatonina durante infecção de células LLC-MK2.

Inicialmente observou-se a redução da proliferação do parasito na célula hospedeira após o tratamento com melatonina durante 24 h, 48 h e 6 dias. O resultado mais expressivo foi observado após 6 dias de tratamento, com expressiva redução de 90% da proliferação. Posteriormente foi realizada a análise da descontinuação do tratamento durante 96 h para observar o comportamento do parasito na célula hospedeira na ausência da melatonina. As

células infectadas foram tratadas durante 24 h, 48 h e 6 dias e então o tratamento foi suspenso durante 96 h, realizada a obtenção do índice de infecção onde observou-se que a proliferação do parasito na célula hospedeira permanece reduzida mesmo após a suspensão do tratamento. A análise por microscopia óptica mostrou que durante o tratamento e após sua suspensão as células se mantiveram visualmente viáveis e com estrutura preservada. O tratamento com melatonina produziu pequenos vacúolos na célula hospedeira contendo reduzido número de parasitos por vacúolo. Para posterior análise e caracterização dos vacúolos, novos experimentos como imunofluorescência a fim de analisar possíveis danos causados a organelas como a mitocôndria podem ser realizados. Células que não foram tratadas apresentaram grande número de parasitos, o que ocasionou seu rompimento após 6 dias de infecção. Elmahallawy e colaboradores (2014) descreveram que o tratamento com melatonina induz a redução da proliferação de *L. infantum* através do colapso da mitocôndria pela cadeia respiratória de elétrons, essencial para a sobrevivência do parasito, corroborando os dados de redução de proliferação obtidos para *T. gondii* que indicam que o tratamento com melatonina pode estar afetando o metabolismo do parasito por vias similares. Experimentos adicionais para análise de parâmetros mitocondriais, como realizado para *L. infantum*, podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de morte celular sofridos pelo *T. gondii* após o tratamento.

Os fármacos atualmente utilizados contra a toxoplasmose se mostram ineficazes na eliminação total do parasito durante a infecção, provocando a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos em tecidos do hospedeiro que podem se reativar e gerar infecção aguda (Djurković-Djaković *et al.*, 1999). A fim de observar a morfologia da célula hospedeira e do parasito após o tratamento e confirmar os resultados obtidos por microscopia óptica realizou-se análise por microscopia eletrônica de varredura. Análise dos resultados demonstraram que o tratamento com melatonina não induz a produção de cistos na célula hospedeira como ocorre com os fármacos utilizados, e mostrou redução do número de parasitos por célula, com vacúolos contendo nenhum ou poucos parasitos. Estes dados sugerem que a melatonina inibe o crescimento do parasito, impedindo sua conversão em bradizoítos e a formação de cistos teciduais.

Possíveis alterações na ultraestrutura do parasito e da célula após o tratamento foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. O tratamento com melatonina pode afetar a ultraestrutura do parasito através da produção de vacúolos em seu citoplasma ou até o rompimento de sua membrana. Tal efeito causa o extravasamento do seu citoplasma dentro da célula hospedeira, o que é característica de morte celular por necrose, bem como a presença de possíveis figuras de mielina, características deste tipo de mecanismo de morte celular. Estudos realizados por Elmahallawy e colaboradores (2014) indicam que o tratamento com melatonina causa a abertura de poros de membrana na mitocôndria de *L. infantum*, o que causa seu colapso e posterior eliminação por mecanismos como necrose e apoptose.

Para verificar se o parasito pode estar sucumbindo por morte celular por apoptose realizou-se ensaio para detecção de fragmentos do DNA (nicks). Os resultados obtidos indicam que parte da população de parasitos morre por esse mecanismo, assim como pode ocorrer em *L. infantum* (Elmahallawy *et al.*, 2014) e *Plasmodium* spp. (Bagnaresi *et al.*, 2012) que também sucumbem por esse mecanismo de morte programada após tratamento com melatonina. Estes resultados sugerem que a melatonina pode agir por mecanismos similares em diferentes parasitos do filo Apicomplexa.

Em termos gerais, os resultados obtidos durante este estudo indicam que a melatonina pode desenvolver papel microbicida durante infecção *in vitro* de células pelo *T. gondii*, como demonstrado para outros parasitos estruturalmente similares a este protozoário. Os próximos passos deste estudo serão a análise *in vivo* de sobrevivência do hospedeiro infectado pelo *T. gondii* durante o tratamento com melatonina, assim como experimentos para melhor compreensão dos seus possíveis mecanismos de ação contra o parasito.

6. Conclusão

O tratamento com melatonina provoca a redução da proliferação parasitária na célula hospedeira, mantendo este perfil mesmo após a descontinuação, além de não induzir a formação de cistos teciduais pelo parasito, como ocorre durante o atual tratamento utilizado. A redução é causada por diferentes mecanismos de morte celular, como necrose e apoptose. O tratamento com melatonina não afetou a morfologia da célula hospedeira e pouco afetou sua proliferação. Estes dados sugerem que a melatonina pode se tornar alternativa para o tratamento da toxoplasmose, auxiliando na produção de novos fármacos com reduzidos efeitos colaterais e maior abrangência terapêutica.

7. Referências

- Aguirre, A. A. et al. **The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies.** *Ecohealth* (2019), 16(2):378-390. doi: 10.1007/s10393-019-01405-7
- Akhoundi, M. et al. **A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and Sandflies.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* (2016), 10(3): e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349
- Al-Adhroey, A. H. et al. **Prevalence and predictors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women from Dhamar, Yemen.** *BMC Infectious Diseases* (2019), 19:1089. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4718-4>
- Alday, P. H.; Doggett, J. S. **Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status.** *Drug Design, Development and Therapy* (2017), 11:273-293
- Álvarez, J. M. et al. **Chagas Disease: Still many unsolved issues.** *Immunology and Infection by Protozoan Parasites* (2014), 2014:912965. doi: 10.1155/2014/912965.
- Ambriz-Tututi, M. et al. **Melatonin: A hormone that modulates pain.** *Life Sciences* (2009), 84: 489-498.
- Araujo, F. G.; Remington, J. S. **Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (1974), 5: 647-651.
- Arora, N. et al. **Microbial vertical transmission during human pregnancy.** *Cell Host & Microbe* (2017), 21(5):561-567.
- Bagnaresi, P. et al. **Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin.** *International Journal of General Medicine* (2009), 2: 47-55.
- Bagnaresi P. et al. **The role of melatonin in parasite biology.** *Molecular Biochemical Parasitology* (2012) 181: 1–6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.09.010. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.010>
- Bahia-Oliveira, L. M. et al. **Highly endemic, water Born e toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases Journal* (2003), 9: 55-62.
- Bahia-Oliveira, L. M.; Gomez-Marin, J.; Shapiro, K. ***Toxoplasma gondii*.** In: **J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros**, (eds) *Global Water Pathogen Project.* (2017) <http://www.waterpathogens.org> (R. Fayer and W. Jakubowski, (eds) Part 3 *Protists*) <http://www.waterpathogens.org/book/toxoplasma-gondii> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.37>
- Baltaci, A. K et al. **Effect of zinc and melatonin supplementation on cellular immunity in rats with toxoplasmosis.** *Biol Trace Elem Res* (2003) 96: 237–245. <https://doi.org/10.1385/BTER:96:1-3:237>
- Baltaci, A. K. et al. **The effect of pinealectomy and zinc deficiency on nitric oxide levels in rats with induced *Toxoplasma gondii* infection.** *Swiss Med Wkly* (2004) 134: 359–363
- Baltaci A. K. et al. **Effects of zinc deficiency and pinealectomy on cellular immunity in rats infected with *Toxoplasma gondii*.** *Biol Trace Elem Res* (2005), 104: 47–56.

- Ben-Harari, R. R.; Goodwin, E.; Casoy, J. **Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review.** *Drugs in R&D* (2017), 17:523-544. doi: 10.1007/s40268-017-0206-8
- Berhouma, M. **Beyond the pineal gland assumption: A neuroanatomical appraisal of dualism in Descartes' philosophy.** *Clinical Neurology and Neurosurgery* (2013), 115: 1661-1670.
- Beverley, J.K. A. **Toxoplasmosis.** *British Medical Journal* (1973), 2: 475-478.
- Beverley, J.K.; Fry, B.A.; **Sulphadimidine, Pyrimethamine and Dapsone in the treatment of toxoplasmosis in mice.** *British Journal of Pharmacology* (1957), 12: 189-193.
- Binquet, C. et al. **The cost-effectiveness of neonatal versus prenatal screening for congenital toxoplasmosis.** *PLoS ONE* 14(9): e0221709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221709>
- Black, M. W.; Boothroyd, J. C. **Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2000), 64(3) 607-623.
- Blader, I.J.; Saeij, J.P. **Comunication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence.** *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* (2009), 117: 458–76.
- Blader et al. **Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later.** *Annual Review of Microbiology* (2015), 69: 463-485.
- Blais, J.; Tardif, C.; Chamberland, S. **Effect of Clindamycin on Intracelular Replication, Synthesis, and Infectivity of *Toxoplasma gondii*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1993), 37(12): 2571-2577.
- Brazão, V. et al. **Melatonin and zinc treatment: distinctive modulation of cytokine production in chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** *Cytokine* (2011), 56: 627-632
- Brazão V. et al. **Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease.** *Immunobiology* (2014) 220: 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.11.018>
- Bubenik, G. A. **Gastrointestinal melatonin. Localization, function, and clinical relevance.** *Digestive Disease and Sciences* (2002), 47: 2336-2348.
- Calvo, J. R.; González-Yanes, C.; Maldonado, M. D. **The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review.** *Journal of Pineal Research* (2013), 55: 103-120.
- Cardinali, D. P.; Rosner, J. M. **Metabolism of serotonin by the rat retina *in vitro*.** *Journal of Neurochemistry* (1971), 18: 1769-1770.
- Cardinali, D. P.; Álvarez, C. B. **Melatonin in Chagas' disease. Possible therapeutic value.** *Medicina* (2011), 71: 477-483.
- Carrero, J. C. et al. **Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries.** *International Journal of Medical Microbiology* (2020), 310(1):151358. doi: 10.1016/j.ijmm.2019.151358.
- Carrillo-Vico, A. et al. **Evidence of melatonin synthesis NY human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance.** *The FASEB journal* (2014), 18: 537-539.

- Cassady, J. V.; Bahler, J. W.; Hinken, M. V. **Spiramycin for toxoplasmosis.** Transactions of the American Ophthalmological (1963), 57(2): 227-232. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(64\)91824-0](https://doi.org/10.1016/0002-9394(64)91824-0)
- Chang, H. R.; Pechère, J. C. **Activity of spiramycin against *Toxoplasma gondii* in vitro, in experimental infections and in human infection.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1988), 22: 97-92.
- Claustrat, B.; Leston J. **Melatonin: Physiological effects in humans.** Neurochirurgie (2005), 61(2-3):77-84. doi: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
- Conti, A.; Conconi, S.; Hertens, E.; Skwarlo-Sonta, K.; Markowska, M.; Maestroni, G. J. M. **Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells.** Journal of Pineal Research (2000), 28: 193-202.
- Dannemann, B., Mccutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J. **Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized Trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group.** Annals of Internal Medicine (1992), 116: 33- 43.
- D'Arcy, M. S. **Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy.** Cell biology international (2019), 43(6): 582-592. doi: 10.1002/cbin.11137.
- Daryani, A. et al. **The potential use of melatonin to treat protozoan parasitic infections: A review.** Biomedicine & Pharmacotherapy (2018), 97:948-957. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.007.
- Da Silva, L. L. R. et al. **Further evidence that naphthoquinone inhibits *Toxoplasma gondii* growth in vitro.** Parasitology International (2015), 64: 622-631.
- De Souza, W. **Secretory organelles of pathogenic protozoa.** Annals of the Brazilian Academy of Sciences (2006), 78(2): 271-291.
- Djurković-Djaković, O. et al. **Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis.** Antimicrob Agents Chemother (1999) 43: 2240–2244
- Doliwa, C. et al. **Sulfadiazine resistance on *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters.** Parasite (2013), 20:19. doi: 10.1051/parasite/2013020.
- Dubey, J. P. - ***Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of human and animals.** In: Krier, J.P., ed. Parasitic Protozoa. San Diego, Academic Press, (1993), 1-157.
- Dubey, J. P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. **Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts.** Clinical Microbiology Reviews (1998), 11: 267-299.
- Dubey, J. P. **History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*.** International Journal for Parasitology (2009) 39: 877-882.
- Dubey J. P. et al. **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.** Parasitology (2012), 139: 1375-1424. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>
- Dunay I. R. et al. **Treatment of toxoplasmosis: historical perspective.** Animal Clinical Microbiology Infection (2018) 31:1–33

- Dunn, D. et al. **Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling.** *Lancet* (1999) 353: 1829–1833. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)
- Elmahallawy, E. K. et al. **Activity of melatonin against *Leishmania infantum* promastigotes by mitochondrial dependent pathway.** *Chem Biol Interact* (2014) 220: 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.016>
- Elmore, S. A. et al. ***Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention.** *Trends in Parasitology* (2010), 26(4):190-6. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.009.
- Falco, E. A. et al. **2:4 Diaminopyrimidines - A new series of antimalarials.** *British Journal of Pharmacology* (1951), 6: 185-200.
- Farhud, D.; Aryan, Z. **Circadian Rhythm, lifestyle and health: A narrative review.** *Iranian Journal of public health* (2018), 47(8): 1068-1076.
- Ferreira, A. I. C. et al. **Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil.** *Epidemiol. Infect.* (2013), (142)142–148.
- França-Botelho, A. C. et al. **Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis.** *Parasite & Vectors* (2011), 4:62
- Frenkel, J.K. **Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. In The Coccidia.** University Park Press. (1973), 343-410.
- Furtado, J. M. et al. **Toxoplasmosis: a global threat.** *Journal of Global Infectious Diseases* (2011), 3(3):281-284, doi: 10.4103/0974-777X.83536.
- Garin, J. P. & Eyles, D. E. **Le traitement de la toxoplasmose expérimentale de la souris par la spiramycine.** *Presse Medicale* (1958), 66:957-8.
- Gilbert R. E. et al. **Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe.** *PLoS Negl Trop Dis* (2008) 2(8): e277. doi:10.1371/journal.pntd.0000277
- Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K. F. **Autophagy: cellular and molecular mechanisms.** *The Journal of Pathology* (2010), 221(1): 3-12.
- Grigg, M. E.; Dubey, J. P. Nussenblatt, R.B. **Ocular toxoplasmosis: A lesson from Brazil.** *American Journal of Ophthalmology* (2015), 159: 999-1001.
- Gross, U. et al. **Developmental Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*.** *Parasitology Today* (1996), 12(1): 30-3.
- Grujic, J. et al. **Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis.** *International Journal of Antimicrobial Agents* (2005), 25(3): 226-230. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.015
- Guha, M. et al. **Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection.** *Journal of Pineal Research* (2007), 43:372–381, doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00488.x
- Haverkos, H. W. **Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE Study Group.** *The American Journal of Medicine.* (1987), 82: 907–914.
- Henriquez, M. et al. **Cell death by necrosis, a regulated way to go.** *Current Molecular Medicine* (2008), 8: 187-206.
- Hill, D. E.; Chirukandoth, S.; Dubey, J. P. **Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals.** *Animal Health Research Reviews* (2005), 6(1):41-61.
- Hill, D. E.; Dubey, J. P. **Toxoplasmosis:** Reston, Va., U.S. Geological Survey Circular (2014) 1389, 84 p., 1 appendix, <http://dx.doi.org/10.3133/cir1389>.

- Hitchings, G.H.; Falco, E.A.; Elion, G.B.; Singer, S. **2,4-Diaminopyrimidines as Antagonists of Folic Acid and Folinic Acid.** Archives of Biochemistry and Biophysics (1952), 40: 479-481.
- Hotta, C. T. et al. **Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites** (2000), 2(7): 466-468.
- Hu, K. et al. **Daughter Cell Assembly in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*.** Molecular Biology of the Cell (2002), 13: 593-606.
- Jeffers, V. et al. **A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*.** Cellular and molecular life sciences (2018), 75(13):2355-2373. doi: 10.1007/s00018-018-2808-x.
- Kantor, M. et al. ***Entamoeba Histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development.** Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology (2018), 2;2018:4601420. doi: 10.1155/2018/4601420.
- Katlama, C. et al. **Pyrimethamin e clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS.** Clinical Infectious Diseases. (1996), 22: 268–275.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br J Cancer (1972) 26: 239–57.
- Laranjeira-Silva, M. F. et al. **Melatonin attenuates *Leishmania (L.) amazonensis* infection by modulating arginine metabolism.** J Pineal Res (2015) 59: 478–487. <https://doi.org/10.1111/jpi.12279>
- Lawry, J. **Detection of apoptosis by the TUNEL assay.** Methods in molecular biology (2004), 887:41-7. doi: 10.1007/978-1-61779-860-3_5.
- Lerner, A. B.; Case, J. D.; Takahashi, Y.; Lee, T. H.; Mori, W. **Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes.** Journal of the American Chemical Society (1958), 80: 2587-2587.
- Liu Q. et al. **Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*.** Parasit Vectors (2015), 1: 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>
- Lourido, S. ***Toxoplasma gondii*.** Trends in Parasitology (2019), 35(11):944-945. doi: 10.1016/j.pt.2019.07.001.
- Lyons, R. E.; Johnson, A. M. **Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*.** Parasite Immunology (1995), 17: 353-359.
- Maenz, M. et al. **Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease.** Progress in retinal and eye research (2014), 39: 77-106.
- Mammari, N. et al. ***Toxoplasma gondii* modulates the host cell responses: an overview of apoptosis pathway.** Biomed Research International (2019) 2019:6152489. doi: 10.1155/2019/6152489. eCollection 2019.
- Markus, R. P. et al. **Immune-pineal axis – acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes.** British Journal of Pharmacology (2018), 175(16):3239-3250. doi: 10.1111/bph.14083.
- Mbongo, N. et al. **Mechanism of Amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes.** Antimicrobial agents and chemotherapy (1998), 42(2): 352-357.
- McMaster, P. R. B. et al. **The effect of two chlorinated Lincomycin analogues against acute toxoplasmosis in mice.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (1973), 22: 14–17.

- Miller, M. A. et al. **Protozoan parasites of marine mammals.** In: Gulland, Frances M.D., Dierauf, Leslie A., Whitman, K.L. (Eds.), CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. CRC Press (2018), pp. 425–470.
- Mocchegiani, E. et al. **The immune-reconstituting effect of melatonin or pineal grafting and its relation to zinc pool in aging mice.** Journal of Neuroimmunology (1994), 53(2):189-201. doi: 10.1016/0165-5728(94)90029-9
- Moncada, P. A.; Montoya, J. G. **Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment.** Expert Review of Anti-infective Therapy (2012), 10:7, 815-828, doi: 10.1586/eri.12.58
- Montazeri, M. et al. **Drug resistance in *Toxoplasma gondii*.** Antimicrob Drug Resist. (2018) 9: 1121–1126. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-595-8_31
- Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. **Toxoplasmosis.** The Lancet (2004), 363: 1965-1976.
- Morar, M. et al. **Structure and Mechanism of the Lincosamide Antibiotic Adenylyltransferase LinB.** Structure (2009), 17(12):1649-1659. doi: 10.1016/j.str.2009.10.013.
- Nath, A., Sinai, A. P. **Cerebral Toxoplasmosis.** Current Treatment Options in Neurology. (2003), 5: 3–12.
- Nicolle, C.; Manceaux, L. **Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi.** Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences (1908), 147: 763-766.
- Niel, G.; Videau, D. **Activité de la spiramycione in vitro sur *Toxoplasma gondii*.** Reunión Inter Discipl. Chimioth. Antiinfect (1981), 121: 8.
- Nishi, M. et al. **Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*.** Journal of Cell Science (2008), 121: 1559-1568.
- Norman, F. F. et al. **Uptade on the major imported protozoan infections in travelers and migrants.** Future Microbiology (2020), 15(3). doi: 10.2217/fmb-2019-0212
- Nosjean, O. et al. **Identification of melatonin-binding Site MT₃ as the quinone reductase 2.** The Journal of Biological Chemistry (2000), 275(40): 31311-31317.
- Nye, F. J. **Treating toxoplasmosis.** Journal of Antimicrobial Chemoterapy (1979), 5: 244-246.
- Oliveira, L. G. R. et al. **Protective actions of melatonin against heart damage during chronic Chagas disease.** Acta Tropica (2013), 128: 652-658.
- Ostrin, L. A. **Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure.** Clinical & Experimental Optometry (2018), 102(2)99-108.
- Pandi-Perumal, S. R. et al. **Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways.** Progress in Neurobiology (2008), 85: 335-353.
- Park, Y. H.; Nam, H. W. **Clinical Features and Treatment of Ocular Toxoplasmosis.** The Korean Journal of Parasitology (2013), 51: 393-399.
- Parzych, K. R.; Klionsky, D. J. **An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation.** Antioxidants & Redox Signaling (2014), 20(3): 460-473. doi: 10.1089/ars.2013.5371.
- Patel, S. et al. **Revisiting the pineal gland: a review of calcification, masses, precocious puberty, and melatonin functions.** International Journal of Neuroscience (2019), 25: 1-12. doi: 10.1080/00207454.2019.1692838.

- Petersdorf, R. G. **Landmark perspective: Sulfadiazine.** JAMA (1984), 251(11): 1475-1476.
- Pinnert-Sindico, S.; Pellerat, J. **A new antibiotic: a spiramycin study of its *in vitro* activity.** Therapie (1956), 11: 308-323.
- Pramanik, P. K. et al. **Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival.** Journal of Global Antimicrobial Resistance (2019), 18: 1-11
- Proskuryakov, S. Y.; Konoplyannikov, A. G.; Gabai, V. L. **Necrosis: a specific form of programmed cell death?** Experimental Cell Research (2003), 283: 1-16.
- Raikhlin, N. T.; Kvetnoy, I. M. **Melatonin and enterochromaffine cells.** Acta Histochemica (1976), 55: 19-24.
- Rajapakse, S. et al. **Antibiotics for human toxoplasmosis: a systematic review of randomized trials.** Pathogens and global health (2013), 107(4): 162-169.
- Ravanan, P.; Srikumar, I. F.; Talwar, P. **Autophagy: The spotlight for cellular stress responses.** Life Sciences (2017), 1;188:53-67. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.029.
- Remington, J. S. et al. **Toxoplasmosis.** In: Remington, J.S. and Klein, J. (eds) **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 5^a edição. Philadelphia, PA: W. B. Saunders, p. 205–346, 2001.
- Robert-Gangneaux, F.; Dardé, M. L. **Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis.** Clinical Microbiology Reviews (2012), 25:264-292.
- Robert-Gangneux, F. et al. **Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a three-year multicenter retrospective study.** Journal of Clinical Microbiology (2015), 53(5):1677-84. doi: 10.1128/JCM.03282-14.
- Robinson, I.; Reddy, A. B. **Molecular mechanisms of the circadian clockword in mammals.** FEBS Letters (2014), 588: 2477-2483.
- Sabin, A. B., Warren, J. **Therapeutic effectiveness of certain sulfonamide on infection by an intracellular protozoon (*Toxoplasma*).** Proceedings of the Society for Experimental Biology And Medicine (1942), 51: 19–23.
- Santello, F. B. et al.. **Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Journal of Pineal Research (2007), 42: 359-363.
- Sapède, C.; Cau, E. **Chapter five – The pineal gland from development to function.** Current Topics in Developmental Biology (2013), 106: 171-215. doi.org/10.1016/B978-0-12-416021-7.00005-5
- Sibley, D. L. et al. **Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans.** Philosophical Transactions of The Royal Society (2009), 364: 2749-2761.
- Shankar, A. H.; Prasad, A. S. **Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection.** The American Journal of Clinical Nutrition (1998), 68(2 Suppl):447S-463S. doi: 10.1093/ajcn/68.2.447S.
- Shapiro, K. et al. **Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food.** Food and Waterborne Parasitology (2019), 15, e00049. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049
- Shen, B. et al. **Activation of chronic toxoplasmosis by transportation stress in a mouse model.** Oncotarget (2016), 7(52): 87351-87360.

- Simonneaux, V.; Ribelayga, C. **Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineals transmitters.** *Pharmacological Reviews* (2003), 55: 325-395.
- Skariah, S.; McIntyre, M. K.; Mordue, D. G. ***Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion.** *Parasitology Research* (2010), 107(2): 253–260. doi:10.1007/s00436-010-1899-6.
- Slominski, A. et al. **On the role of melatonin in skin physiology and pathology.** *Endocrine* (2005), 27: 137-147.
- Smieja, M. **Current indications for the use of clindamycin: A critical review.** *Canadian Journal of Infectious Diseases* (1998), 9(1): 22-28.
- Splendore, A. **Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo.** Nota 56 preliminare pel., *Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo* (1908), 3: 109–112.
- Stanley, S. L. **Amoebiasis.** *The Lancet* (2003), 361(9362), 1025-1034. doi:10.1016/s0140-6736(03)12830-9
- Sundar, S. et al. **Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use.** *Clinical Infectious Diseases* (2012), 55(4):543–50. doi: 10.1093/cid/cis474
- Syntichaky, P.; Tavernarakis, N. **Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?** *European Molecular Biology Organization* (2002), 3(7): 604-609.
- Tait, S. W. G.; Ichim, G.; Green, D. R. **Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death.** *Journal of Cell Science* (2014), 127: 2135-2144, doi:10.1242/jcs.093575
- Taliaferro W. H.; Taliaferro L. G. **Morphology, periodicity and course of infection of *Plasmodium brasilianum* in Panamanian monkeys.** *Am J Hyg.* 1934;20:1–49.
- Teixeira, M. M.; Gazzinelli, R. T.; Silva, J. S. **Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection.** *TRENDS in parasitology* (2002), 18(6): 262-265.
- Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. ***Toxoplasma gondii*: from animals to humans.** *International Journal of Parasitology* (2000), 30: 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Tosini, G.; Menaker, M. **The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration.** *Brain Research* (1998), 789: 221-228.
- Van Cruchten, S.; Van Den Broeck, W. **Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis.** *Anatomia, histologia, embryologia* (2002), 31(4): 214-223.
- Triana, M. A. H. et al. **Calcium signaling and the lytic cycle of the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (2018), 1865(11): 1846-1856.
- Vanecek, J. **Cellular mechanisms of melatonin action.** *Physiological Reviews* (1998), 78: 687-711.
- Vicencio, J. M. et al. **Senescence, Apoptosis or Autophagy?** *Gerontology* (2008), 54: 92-99. doi: 10.1159/000129697
- Wallon, M. et al. **Congenital *Toxoplasma* Infection: Monthly Prenatal Screening Decreases Transmission Rate and Improves Clinical Outcome at Age 3 Years.** *Clinical Infectious Diseases* (2013), 2013;56(9):1223–31

- Wang, Z. D. et al. ***Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis.** *Frontiers in Microbiology* (2017), 8:389. doi: 10.3389/fmicb.2017.00389
- Weiss, L. M.; Dubey, J. P. **Toxoplasmosis: a history of clinical observations.** *International Journal for Parasitology* (2009), 39(8): 895-901. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.004.
- Weiss, L. M.; Kim, K. ***Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. Perspectives and Methods.** Academic Press (2007), 1:800.
- Weiss, L. M.; Kim, K. **The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*.** *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* (2011), 5: D391–D405.
- Wolf A.; Cowen D. **Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man.** *Bull Neur Inst NY* (1937), 6: 306-371.
- Wong, S.Y.; Remington, J.S. **Biology of *Toxoplasma gondii*.** *AIDS* (1993), 7: 299-316.
- World malaria report 2019.** Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Zhang, H.; Zhang, Y. **Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions.** *Journal of Pineal Research* (2014), 57: 131-146.