

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Nayara Inocencio Machado

Tratamento com melatonina de infecções *in vitro* e *in vivo* pelo  
*Toxoplasma gondii*

Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil

Fevereiro de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO

Nayara Inocencio Machado

Tratamento com melatonina de infecções *in vitro* e *in vivo* pelo  
*Toxoplasma gondii*

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

Coorientador: Renato Augusto DaMatta

Orientador: Sergio Henrique Seabra

Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil

Fevereiro de 2016

# **TRATAMENTO COM MELATONINA DE INFECÇÕES *in vitro* E *in vivo* PELO *Toxoplasma gondii***

**NAYARA INOCENCIO MACHADO**

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

Examinada em 26 de fevereiro de 2016

---

Prof<sup>a</sup>. Jessica Many Dias Bittencourt Vieira (Doutora em Ciências - Microbiologia) -  
UEZO

---

Prof. Thiago Motta Venâncio (Doutor em Bioinformática) - UENF

---

Prof. Clóvis de Paula Santos (Doutor em Medicina Veterinária – Parasitologia  
veterinária) - UENF

---

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências) - UENF

Coorientador

---

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Doutor em Ciências) – UEZO/UENF

Orientador

“Onde o final feliz é só o começo da história a se traçar (...)”  
Mauricio Baia

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus primeiramente pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado. Não me deixou desistir em nenhum minuto, me fazendo acordar a cada dia com a esperança de um ótimo dia.

Agradeço aos meus pais, Edson e Rosangela, por nunca terem desanimado comigo, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, por serem os melhores ouvidos e olhos que eu poderia ter, por toda a proteção, todas as orações durante os momentos mais difíceis e por todo o amor, que não tem tamanho, lugar, idade e é meu.

Agradeço ao meu irmão, Bruno, e a minha cunhada, Carla, pelos exemplos de garra e força de vontade, de persistência e perseverança. Tenho orgulho e me espelho muito em vocês.

Agradeço a minha família, avôs, avós, tias, primas, primo, tio, por sempre comemorarem comigo todos os meus sucessos, e me ampararem quando o caminho é um pouco desviado.

Agradeço ao meu orientador, Sergio Henrique Seabra, por nunca desanimar, mesmo quando tudo estava difícil. Por toda a paciência, todas as risadas. Você foi meu maior exemplo dentro dessa carreira e te agradeço por isso. Obrigada pela oportunidade desde a iniciação científica, até agora. E que esteja comigo sempre, em todas as fases que ainda estão por vir.

Agradeço ao meu coorientador, Renato Augusto DaMatta, por todo o auxílio em todas as etapas, por estar presente mesmo se desdobrando dentre tantas tarefas. Por ter me recebido de braços e coração abertos, obrigada! E que essa companhia perdure por muito tempo.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, que sempre me ajudaram, desde o início. Se não fosse por vocês, eu não teria chegado até aqui: Juliana Portes, Thiago Alves, Tatiana Guinancio, Thayane Borges, Amanda Hemerly, Pedro Rodrigues. E aos mais novos, por me permitirem, dentro dos meus limites, ajudá-los nesse início, nessa nova etapa: Yago Rodrigues, Felipe Moreira, Thamyres Vianna, Hellen Fernandes, Pedro Theófilo.

Aos técnicos Eliandro Lima, Adriano Pereira e Patricia Nascimento, por todo o auxílio durante estes anos.

Aos amigos da UENF, por toda a disponibilidade, toda a ajuda e auxílio no desenvolvimento dos experimentos. Pela companhia do almoço no bandeirão, às

festas de confraternização e o SBPz de nossas vidas: Fernanda Silva, Julia Resende, Juliana Azevedo, Gabriel Rabello, Natalia Almeida, Thiago Torres.

Agradeço a UENF, UEZO, FAPERJ, CNPq e CAPES que disponibilizaram toda a verba necessária para o desenvolvimento deste trabalho. A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ESQUEMAS, FIGURAS E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                             | <b>14</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                  | <b>16</b> |
| 2.1. Toxoplasmose.....                                | 16        |
| 2.1.2. Toxoplasmose Congênita.....                    | 17        |
| 2.1.3. Toxoplasmose Ocular.....                       | 17        |
| 2.1.4. Epidemiologia da Toxoplasmose.....             | 18        |
| 2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> .....                   | 19        |
| 2.3. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....  | 20        |
| 2.4. Ultraestrutura de <i>Toxoplasma gondii</i> ..... | 22        |
| 2.4.1. Taquizoítos.....                               | 22        |
| 2.4.2. Bradizoítos.....                               | 23        |
| 2.5. Tratamento para Toxoplasmose.....                | 25        |
| 2.5.1. Sulfadiazina.....                              | 26        |
| 2.5.2. Pirimetamina.....                              | 27        |
| 2.5.3. Espiramicina.....                              | 28        |
| 2.5.4. Clindamicina.....                              | 29        |
| 2.6. Melatonina.....                                  | 30        |
| 2.6.1. A glândula pineal.....                         | 30        |
| 2.6.2. Ciclo Circadiano.....                          | 31        |
| 2.6.3. Biossíntese de Melatonina.....                 | 32        |
| 2.6.4. Quimioterapia com Melatonina.....              | 33        |
| 2.7. Morte celular.....                               | 36        |
| 2.7.1. Apoptose.....                                  | 37        |
| 2.7.2. Necrose.....                                   | 39        |
| 2.7.3. Autofagia.....                                 | 40        |
| <b>3. Objetivos.....</b>                              | <b>42</b> |

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1. Objetivo Geral.....                                                                                            | 42        |
| 3.2. Objetivos Específicos.....                                                                                     | 42        |
| <b>4. Materiais e Métodos.....</b>                                                                                  | <b>43</b> |
| 4.1. Células LLC-MK2.....                                                                                           | 43        |
| 4.2. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                                                  | 43        |
| 4.3. Interação parasito-célula hospedeira.....                                                                      | 43        |
| 4.4. Tratamento com melatonina.....                                                                                 | 44        |
| 4.5. Preparo de amostras para microscopia óptica de luz e obtenção de índice de infecção pós-tratamento.....        | 44        |
| 4.6. Ensaio para apoptose por técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) ..... | 44        |
| 4.7. Preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura.....                                              | 45        |
| 4.8. Preparo de amostras para microscopia eletrônica de transmissão.....                                            | 45        |
| 4.9. Teste <i>in vivo</i> .....                                                                                     | 45        |
| 4.10. Análise dos dados.....                                                                                        | 46        |
| <b>5. Resultados.....</b>                                                                                           | <b>47</b> |
| <b>6. Discussão.....</b>                                                                                            | <b>59</b> |
| <b>7. Conclusão.....</b>                                                                                            | <b>62</b> |
| <b>8. Referências Bibliográficas.....</b>                                                                           | <b>63</b> |

### Lista de abreviaturas e siglas

- **5-HT:** 5-Hidroxitriptamina
- **μM:** Micromolar
- **AAAD:** Descarboxilase de ácidos aromáticos
- **AA-NAT:** Arilalquilamina N-acetiltransferase
- **AMP-Cíclico:** Monofosfato de adenosina cíclico
- **DHFR:** Dihidrofolato redutase
- **DMEM:** Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **GAMA:** Ácido gama-aminobutírico
- **HIOMT:** Hidroxiindol-O-metiltransferase
- **IL-2:** Interleucina 2
- **iNOS:** Óxido nítrico sintase-induzível
- **MEL:** Melatonina
- **mM:** Milimolar
- **NAS:** N-acetilserotonina
- **NK:** “Natural killer”
- **NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- **PABA:** Ácido paraminobenzóico
- **PBS:** Solução tamponada de fosfato
- **PHEM:** Pipes, Hepes, EGTA, Magnésio
- **RNA:** Ácido ribonucleico
- **ROS:** Espécies reativas de oxigênio
- **SFB:** Soro fetal bovino
- **TPOH:** 5-hidroxitriptofano

### Lista de esquemas, figuras e tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Esquema 1</b> – Distribuição do <i>Toxoplasma gondii</i> pelo Brasil (Traduzido de Dubey et al., 2012)                                                                                                                                    | <b>19</b> |
| <b>Esquema 2</b> - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> (Traduzido de Sibley et al., 2009).                                                                                                                                             | <b>21</b> |
| <b>Esquema 3</b> - Esquema da ultraestrutura da forma taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> . (Traduzido de Dubey et al., 1998).                                                                                                            | <b>23</b> |
| <b>Esquema 4</b> - Esquema da ultraestrutura da forma bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> . (Traduzido de Dubey et al., 1998).                                                                                                            | <b>25</b> |
| <b>Esquema 5</b> - Estrutura química da Sulfadiazina (Obtido de Al-Lohedan & Ali, 2013).                                                                                                                                                     | <b>27</b> |
| <b>Esquema 6</b> - Estrutura química da Pirimetamina (Obtido de Perold et al., 2014).                                                                                                                                                        | <b>27</b> |
| <b>Esquema 7</b> - Estrutura química da Espiramicina (Obtido de: <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419898#section=Top">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419898#section=Top</a> . Acessado em 06/11/2015 às 17:32). | <b>28</b> |
| <b>Esquema 8 - A)</b> Estrutura química da Lincomicina. <b>B)</b> Estrutura química da Clindamicina. No detalhe, a substituição do grupamento hidroxila por uma molécula de cloro (Adaptado de Morar et al., 2009).                          | <b>29</b> |
| <b>Esquema 9</b> - Esquema da síntese de melatonina a partir do aminoácido triptofano. (Adaptado de Simonneaux & Ribelayga, 2003).                                                                                                           | <b>33</b> |
| <b>Esquema 10</b> - Estrutura química da melatonina (Retirado de Di Bella et al., 2013).                                                                                                                                                     | <b>33</b> |
| <b>Esquema 11</b> - Diagrama ilustrando as etapas que se desenvolvem durante o processo de morte celular programada (apoptose) (Adaptado de Kerr et al., 1972).                                                                              | <b>38</b> |
| <b>Esquema 12</b> - Diagrama ilustrando as diferenças entre os tipos de mortes celulares necrose e apoptose. (Adaptado de Van der Meer et al., 2010).                                                                                        | <b>40</b> |
| <b>Esquema 13</b> - Diagrama ilustrando os três tipos de morte celular programada: apoptose, necrose e autofagia. (Adaptado de Henriquez et                                                                                                  | <b>41</b> |

|                                                                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>al.</i> , 2008).                                                                                                                                                                    |           |
| <b>Figura 1</b> - Imagens de campo claro de células LLC-MK2 infectadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i> , tratadas ou não com melatonina após 24h, 48h e 6 dias de infecção.              | <b>47</b> |
| <b>Figura 2</b> - Índice de infecção de células LLC-MK2 infectadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i> após 24h, 48h e 6 dias de infecção, tratadas ou não com melatonina.                   | <b>48</b> |
| <b>Figura 3</b> - Imagens por contraste de interferência diferencial e fluorescência após ensaio de TUNEL de células infectadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i> tratadas com melatonina. | <b>50</b> |
| <b>Figura 4</b> - Microscopia eletrônica de varredura de células hospedeiras LLC-MK2 infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> , tratadas ou não com melatonina, após 48h.               | <b>52</b> |
| <b>Figura 5</b> - Microscopia eletrônica de varredura de células hospedeiras LLC-MK2 infectadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i> , tratadas ou não com melatonina, após 6 dias.           | <b>53</b> |
| <b>Figura 6</b> - Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> na ausência e presença do tratamento com melatonina após 24h.               | <b>55</b> |
| <b>Figura 7</b> - Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> na ausência e presença do tratamento com melatonina após 48h.               | <b>56</b> |
| <b>Figura 8</b> - Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> na ausência e presença do tratamento com melatonina após 6 dias.            | <b>57</b> |
| <b>Figura 9</b> - Sobrevivência de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> durante tratamento com melatonina ou sulfadiazina.                                              | <b>58</b> |

## Resumo

Sabe-se que o tratamento atualmente utilizado para a toxoplasmose possui efeitos colaterais, sendo essencial o desenvolvimento de novas terapias para minimizá-los, mas mantendo ampla abrangência profilática e terapêutica. Melatonina é um hormônio que participa do ciclo circadiano em vertebrados e possui funções antioxidantes, imunomoduladoras e antitumorais. Demonstrou-se que a melatonina é capaz de modular a resposta imune e o desenvolvimento parasitário durante infecção por *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos do tratamento com melatonina de células epiteliais LLC-MK2 infectadas por *T. gondii*. Portanto, células infectadas, tratadas ou não com melatonina, foram analisadas por microscopia óptica e o índice de infecção quantificado, mostrando redução na proliferação parasitária após o tratamento, especialmente após 6 dias. O possível tipo de morte do parasito causada pelo tratamento com melatonina foi verificado. Marcação positiva para apoptose em parte da população de parasitos foi observada após tratamento. Além disso, análise por microscopia eletrônica foi realizada a fim de avaliar a morfologia da célula hospedeira e do parasito. Resultados de microscopia eletrônica de varredura indicam redução na proliferação parasitária, corroborando os dados de índice de infecção. Análise por microscopia eletrônica de transmissão indicou morte do parasito por necrose, com rompimento de sua membrana e extravasamento do citoplasma. Experimentos *in vivo* foram realizados para analisar a sobrevivência do hospedeiro após tratamento com melatonina ou sulfadiazina (composto atualmente utilizado) indicando eficácia similar no tratamento com os dois compostos. Estes resultados sugerem que o tratamento com melatonina pode ser uma alternativa terapêutica para Toxoplasmose, reduzindo a proliferação parasitária no organismo hospedeiro.

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

## Abstract

It is known that the current treatment used for toxoplasmosis has side effects, being essential the development of new therapies with the capacity to reduce side effects, while 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. It has been shown that melatonin is able to modulate the immune response and parasite development during infection by *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. The aim of this study was to analyze the effects of melatonin treatment in LLC-MK2 epithelial cells infected by *T. gondii*. Hence, infected cells treated or not with melatonin were examined by optical microscopy and the infection rate quantified, showing reduction in the parasite proliferation after treatment, especially after 6 days. The possible type of death of the parasite caused by melatonin treatment was analyzed. Positive staining for apoptosis in the population of the parasite was observed after treatment. Furthermore, analysis by electron microscopy was performed to assess the morphology of the host cell and the parasite. Scanning electron microscopy results indicate reduction in parasitic proliferation, corroborating the infection rate data. Analysis by transmission electron microscopy indicated the parasite death by necrosis, with plasma membrane rupture and cytoplasm leakage. *In vivo* experiments were performed to analyze the survival of the host after treatment with melatonin or sulfadiazine (compound currently used) and similar efficacy was obtained with both treatments. These results suggest that the use of melatonin may be an alternative treatment for toxoplasmosis, reducing the parasitic proliferation in the host organism.

Keywords: Immunomodulation, Melatonin, *Toxoplasma gondii*

## 1. Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial e afeta cerca de um terço da população mundial, sendo a infecção assintomática em pacientes imunocompetentes (Tenter *et al.*, 2000). Pacientes imunocomprometidos podem apresentar sintomas graves, como a supressão medular. O tratamento se dá através da administração de fármacos antifolato como a sulfadiazina e a pirimetamina. Em gestantes, o feto pode ser gravemente atingido e o tratamento diferenciado ocorre pela administração do fármaco espiramicina, sendo este não-tóxico, incapaz de atravessar a placenta, reduzindo os riscos para o feto (Garin & Eyles, 1958; Niel *et al.*, 1981; Li *et al.*, 2014). Para pacientes alérgicos à sulfadiazina, a alternativa para tratamento é a utilização de clindamicina (Dannemann *et al.*, 1992; Katlama *et al.*, 1996; Montoya & Liesenfeld, 2004). Para todos os casos, é essencial a administração concomitante de ácido fólico aos pacientes (revisto por Haverkos, 1987).

O hormônio melatonina é molécula altamente conservada sendo produzida pela glândula pineal (Bagnaresi *et al.*, 2012), retina (Cardinali & Rosner, 1971, Tosini & Menaker, 1998), trato gastro-intestinal (Raikhlín & Kvetnoy, 1976, Bubenik, 2002), pele (Slominski *et al.*, 2005) e medula óssea (Conti *et al.*, 2000). Este hormônio regula o sono durante o ciclo circadiano (Srinivasan *et al.*, 2010), dividindo-o em fases clara e escura de acordo com sua produção e atividade (Bagnaresi *et al.*, 2012). No entanto, estudos recentes demonstram que a melatonina possui atividade quimioterápica e terapêutica, sendo capaz de reduzir os danos causados pela infecção por parasitos como *Plasmodium* spp. (Srinivasan *et al.*, 2010), *Trypanosoma cruzi* (Oliveira *et al.*, 2013) e *Leishmania infantum* (Elmahallawy *et al.*, 2014). Na infecção por *Plasmodium* spp. a melatonina mostrou atividade antioxidante, reduzindo os danos causados nos hepatócitos durante a infecção (Srinivasan *et al.*, 2010). A melatonina é capaz de reduzir processos inflamatórios causados pela cardiomiopatia gerada por infecção crônica por *T. cruzi* (Oliveira *et al.*, 2013). Na leishmaniose visceral, causada pelo parasito *Leishmania infantum*, a melatonina mostrou capacidade de alterar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, além de causar desequilíbrio nas concentrações de nitrito intracelular do parasito, o que pode indicar possível atividade microbicida da melatonina (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Embasado nestas informações, o objetivo deste estudo foi analisar a eficácia da melatonina no tratamento da infecção por *Toxoplasma gondii*. Para tal, realizaram-se interações *in vitro* utilizando células epiteliais LLC-MK2 e taquizoítos de *T. gondii*. Após interação, as células infectadas foram tratadas com melatonina e fixadas nos tempos de 24h, 48h e 6 dias para análise por microscopia óptica e quantificação do índice de infecção. Esse material também foi analisado por microscopia eletrônica de varredura e transmissão para a caracterização ultraestrutural. Experimentos *in vivo* em camundongos Balb/C foram realizados para avaliar a sobrevivência dos hospedeiros quando tratados com melatonina ou sulfadiazina.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Toxoplasmose

A Toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (Tenter *et al.*, 2000), podendo infectar hospedeiros vertebrados, como seres humanos (Lyons & Johnson, 1995). Pelo menos 30% da população mundial está infectada cronicamente por *T. gondii* (Dubey, 2012, Grigg *et al.*, 2015). A doença ocorre em sua maioria em países tropicais e sua distribuição está relacionada às condições ambientais, à população de gatos presente e aos hábitos de vida locais (Campos *et al.*, 2014). No entanto, a maioria das infecções não apresenta sintomas, especialmente em pacientes imunocompetentes. Pacientes imunocomprometidos, como portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), gestantes que podem transmitir a infecção congenitalmente, pacientes transplantados, entre outros, podem desenvolver sintomas severos. Em casos de pacientes imunocomprometidos, o desenvolvimento da doença está na maioria das vezes relacionado à reativação de infecção crônica por *T. gondii* devido à redução da atividade do sistema imune (Campos *et al.*, 2014).

A infecção primária de gestantes pode causar toxoplasmose congênita, visto que o parasito é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto (Weiss & Kimm, 2007). Este parasito pode se multiplicar na maioria das células nucleadas, possuindo tropismo pelos tecidos do sistema nervoso central e dos olhos, sendo estes os locais mais comuns de ocorrência da doença (Ferguson, 2009). Em recém-nascidos portadores de Toxoplasmose pode ocorrer inflamação da retina (coriorretinite) e acúmulo de líquido céfalo-raquidiano no interior da cavidade craniana (hidrocefalia) (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 taquizoíta do parasito a fim de que seja reduzida a transmissão transplacentária (Garin & Eyles, 1958; Niel *et al.*, 1981).

As formas mais comuns de adquirir Toxoplasmose 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). Esta forma de infecção através de alimentos contaminados é denominada toxoplasmose adquirida. A infecção crônica pode ser reativada caso haja supressão do sistema imune, podendo levar o paciente a desenvolver encefalite toxoplásmica, inflamação do miocárdio (miocardite) e inflamação do pulmão (pneumonite) (Liu *et al.*, 2015).

### **2.1.2. Toxoplasmose Congênita**

No Brasil, a prevalência de mulheres grávidas infectadas por *T. gondii* pode variar de 50% a 80% de acordo com a população analisada (Da Silva *et al.*, 2015). A infecção crônica de mulheres por *T. gondii* é frequentemente assintomática e pode não gerar sintomas graves à gestante e ao feto (Da Silva *et al.*, 2015). Porém, pode ocorrer reativação da infecção durante o período gestacional, podendo comprometer o desenvolvimento fetal (Oz, 2014) ou causar abortos espontâneos (Grigg *et al.*, 2015). A infecção adquirida por mulheres durante a gestação pode também causar sérios problemas ao feto (Dunn *et al.*, 1999). A infecção do feto por *T. gondii* ocorre inicialmente pela passagem dos taquizoítos da corrente sanguínea da gestante para a placenta, que entra em contato com a corrente sanguínea do feto, ocorrendo a infecção e caracterizando a toxoplasmose congênita (Montoya & Liesenfeld, 2004).

A toxoplasmose congênita pode gerar sérias complicações ao feto durante o seu desenvolvimento intrauterino e ao longo de sua vida, como inflamação e infecção do cérebro (encefalite), distúrbios cardiovasculares como dilatação ventricular, deficiências visuais como a retinocoroidite (Gras *et al.*, 2005) e deficiências auditivas e mentais (Oz, 2014). Estas lesões afetam cerca de 80% dos recém-nascidos portadores de Toxoplasmose congênita (Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009).

### **2.1.3. Toxoplasmose Ocular**

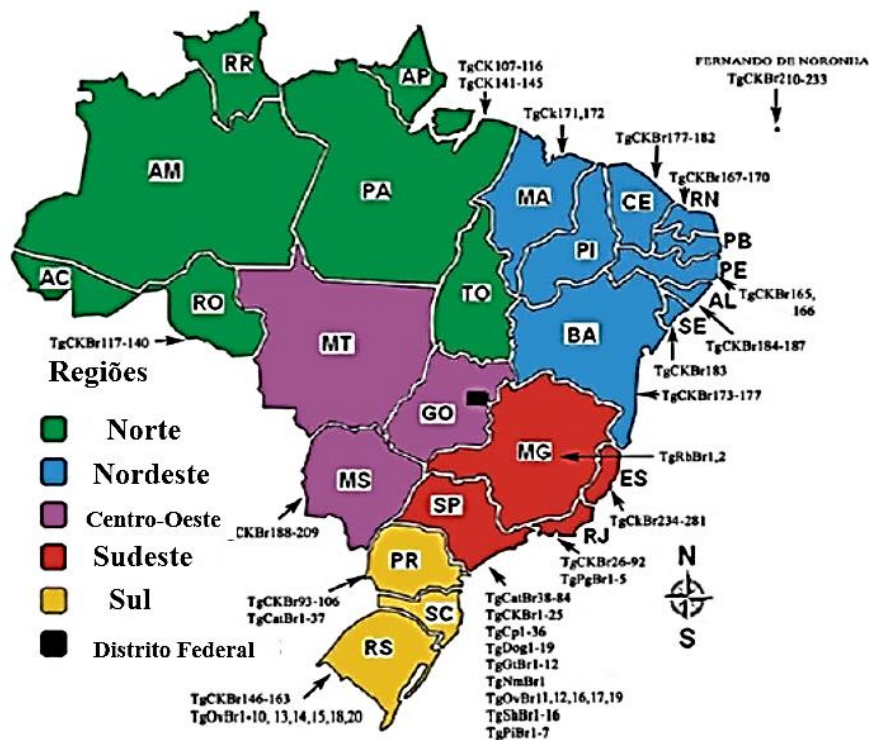
A toxoplasmose ocular é uma doença que acomete um a cada seis indivíduos infectados por *T. gondii* em regiões endêmicas no Brasil (Grigg *et al.*, 2015). Responsável por danos graves à retina, a toxoplasmose ocular pode levar o paciente à cegueira (Holland, 2003) sendo a maior responsável pelo desenvolvimento de uveítes (Machado *et al.*, 2014). Durante muitos anos, achou-se

que a principal fonte de toxoplasmose ocular era através de transmissão congênita da doença (Silveira *et al.*, 1988). No entanto, estudos demonstram que infecções adquiridas, através da ingestão de alimentos e água contaminados por *T. gondii*, podem ser a maior fonte de desenvolvimento de toxoplasmose ocular (Atmaca *et al.*, 2004, Park & Nam, 2013). Pacientes imunocomprometidos são severamente afetados devido à diminuição da ação do sistema imune do hospedeiro e o desenvolvimento da lesão ocular (Subauste *et al.*, 2011). Kijlstra & Petersen (2013) descreveram que para cada 400 portadores de toxoplasmose pelo mundo, pelo menos um desenvolve algum tipo de doença ocular devido à infecção. O'Connor (1974) descreveu que a administração de sulfadiazina combinada com pirimetamina não apresenta grande eficácia na toxoplasmose crônica quando comparado à efetividade do tratamento da infecção aguda em casos de toxoplasmose ocular.

#### **2.1.4. Epidemiologia da Toxoplasmose**

O Brasil é um país extenso que possui mais de 190 milhões de habitantes (Dubey *et al.*, 2012). Quando se trata de toxoplasmose, estima-se que cerca de 90% dos animais domésticos e silvestres apresentam antígenos contra *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2012). A ingestão de oocistos presentes no ambiente e o consumo de carnes contaminadas com cistos teciduais são as duas maiores fontes de transmissão da toxoplasmose (Dubey *et al.*, 2012).

No Brasil grandes áreas ambientais estão altamente contaminadas por oocistos de *T. gondii*, dificultando a demarcação de locais específicos onde há contaminação (Esquema 1). Dados epidemiológicos indicam que 50% das crianças e 80% das mulheres em idade fértil apresentam anticorpos para este parasito (Dubey *et al.*, 2012). A toxoplasmose é uma doença que acomete todo o mundo, porém, com diferentes taxas epidemiológicas. Menores índices de infecção (10% a 30%) são relatados na América do Norte, Sudeste da Ásia, Norte da Europa e alguns países do continente africano. Taxas medianas de infecção (30% a 50%) são encontradas em países centrais e do sul da Europa, e altas taxas tem sido descritas para países da América Latina e América do Sul (Robert-Gangneaux & Dardé, 2012).



**Esquema 1. Distribuição do *Toxoplasma gondii* pelo Brasil.** Mapa do Brasil dividido pelas suas regiões e os locais onde foram encontradas cepas de *Toxoplasma gondii* ao longo dos anos, sendo caracterizadas pela sua genotipagem. Traduzido de Dubey *et al.* (2012).

## 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 (1908) em roedor (*Ctenodactylus gundi*) no Norte da África. O primeiro caso de toxoplasmose congênita em humanos foi descrito por Wolf e Cowen (1937). *Toxoplasma gondii* é um parasito capaz de infectar grande gama de hospedeiros vertebrados como os seres humanos, tendo como hospedeiros definitivos os membros da família *Felidae* (Lyons & Johnson, 1995).

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). Cepas deste parasito são classicamente agrupadas genotipicamente em três tipos diferentes: cepas do tipo I estão associadas à infecção aguda; cepas do tipo II estão presentes

predominantemente em pacientes imunocomprometidos, em infecções congênitas ou oculares; e as cepas do tipo III são usualmente isoladas de animais (Campos *et al.*, 2014). No entanto, trabalhos recentes descrevem que existe grande diversidade de cepas de *T. gondii* com genótipos distintos, principalmente as isoladas na América do Sul (Dubey *et al.*, 2012, Rajendran *et al.*, 2012).

### **2.3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* tem como hospedeiros definitivos os membros da família *Felidae* e como hospedeiros intermediários mamíferos e aves. Suas principais formas infectivas são bradizoítos, responsáveis pela formação de cistos teciduais, e esporozoítos encontrados em oocistos. A principal forma de infecção é através de água e vegetais contendo oocistos e carnes contaminadas por cistos teciduais (Wong & Remington, 1993).

Após a ingestão de alimentos ou água contaminados (Esquema 2), a parede externa dos cistos teciduais ou oocistos é rompida através de degradação enzimática, liberando a forma bradizoíto ou esporozoíto, respectivamente, no intestino do hospedeiro, ocorrendo rápidas invasões do epitélio celular (Dubey & Frenkel, 1973; Blader & Saeij, 2009; Sibley *et al.*, 2009).

Na célula hospedeira ocorre a diferenciação dos bradizoítos ou esporozoítos para a forma taquizoíto, sendo esta a forma de proliferação rápida. Essa proliferação faz com que a célula hospedeira se rompa, liberando taquizoítos que infectam outras células, se disseminando pelo organismo via corrente sanguínea e linfática. A rápida proliferação dos taquizoítos com lise das células hospedeiras caracteriza a fase aguda da doença (ciclo lítico).

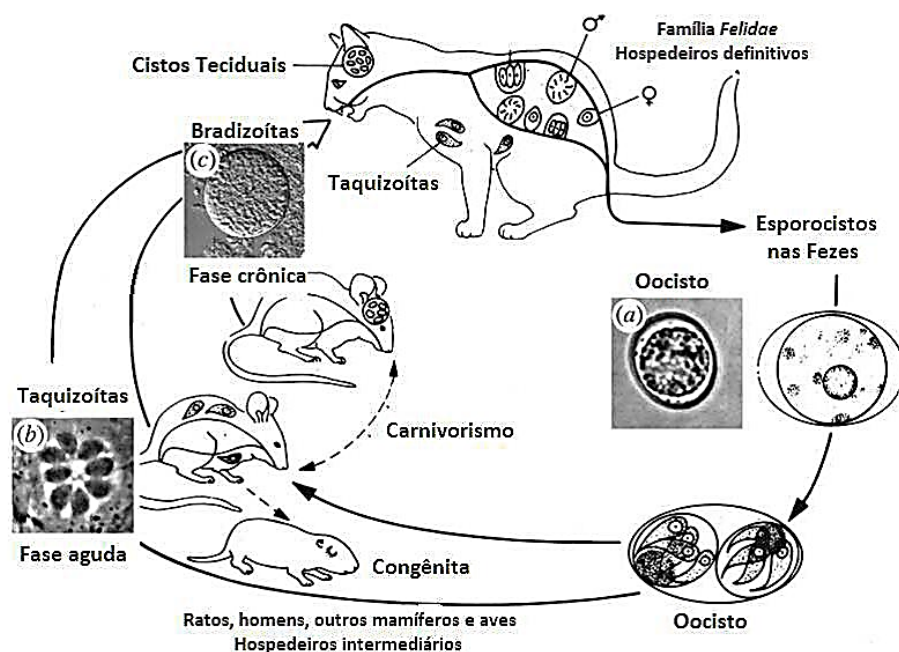
Quando o sistema imune age sobre a infecção, a forma taquizoíto sofre nova diferenciação em bradizoíto. Esta forma é de multiplicação lenta e forma os cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da doença (Sibley *et al.*, 2009).

Nos membros da família *Felidae* o parasito infecta as células intestinais denominadas enterócitos e podem seguir dois destinos distintos: se diferenciarem em taquizoítos e seguirem o que foi descrito acima nos hospedeiros intermediários, ou sofrerem uma série de esquizogonias nos enterócitos com liberação de

merozoítos no lúmen intestinal, aumentando o seu número. Após a liberação dos merozoítos, esse se diferencia em gametas masculinos e femininos.

Gametas masculinos possuem flagelo, são liberados no lúmen intestinal, invadem os enterócitos e fecundam gametas femininos. Após a fecundação, são formados zigotos diplóides (oocisto não-esporulados) que são posteriormente liberados ao ambiente através das fezes do hospedeiro definitivo. No ambiente o oocisto esporula formando esporozoítos (oocisto esporulado) através da divisão mitótica e meiótica do zigoto em oito progêneses haplóides (Wong & Remington, 1993).

A reativação da infecção ocorre em casos de imunossupressão, nos quais os cistos teciduais presentes no cérebro e característicos da forma latente da doença irão se romper, liberando novamente a forma taquizoíto pela corrente sanguínea do hospedeiro, retomando a forma aguda da infecção (Dubey *et al.*, 1998).



**Esquema 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.** Formação de oocistos não-esporulados ocorre nos membros da família *Felidae* através de reprodução sexual. A liberação no ambiente é seguida da esporulação dos oocistos gerando esporozoítos. (a) Oocistos são capazes de infectar hospedeiros através da disseminação pela água e alimentos contaminados. Na fase aguda da infecção, (b) taquizoítos multiplicam-se rapidamente e podem ser transmitidos congênita. Na fase crônica da infecção, (c) bradizoítos formam cistos teciduais em tecidos do hospedeiro. Tais cistos são contraídos por via oral, reiniciando o ciclo. Traduzido de Sibley *et al.* (2009).

## **2.4. Ultraestrutura de *Toxoplasma gondii***

### **2.4.1. Taquizoítos**

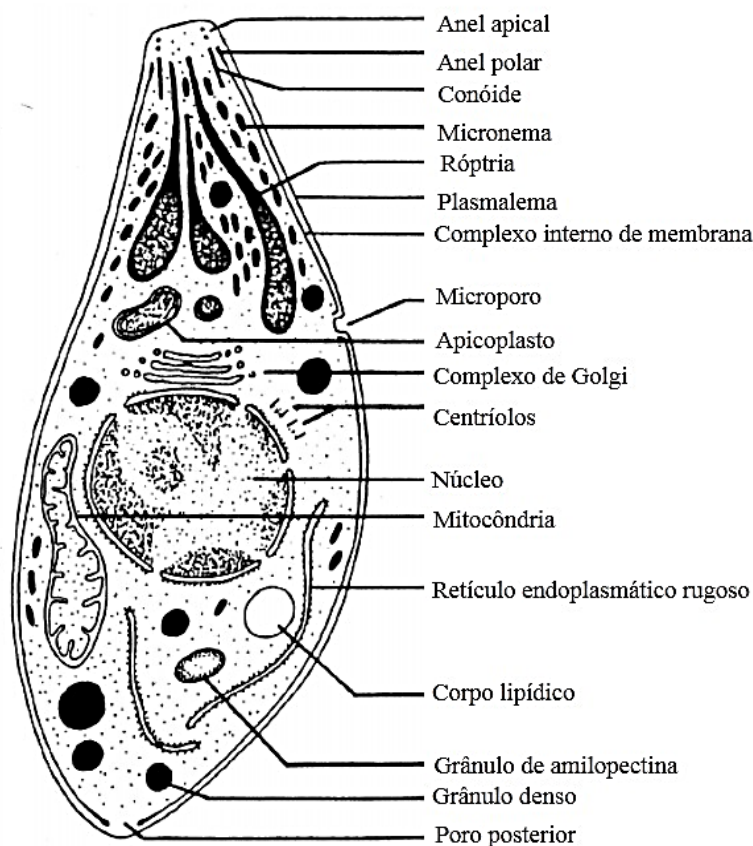
A forma taquizoíto (do grego, taqui = rápido) (Esquema 3) foi descrita por Frenkel (1973) como a forma de multiplicação rápida de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 1998). Os taquizoítos são capazes de infectar todas as células nucleadas e se disseminar facilmente pelo organismo do hospedeiro (Halonen & Weiss, 2013). Os taquizoítos são extremamente sensíveis às condições ambientais e são rapidamente degradados quando encontrados fora do hospedeiro, sendo a maior fonte de transmissão vertical da toxoplasmose. Além desta sensibilidade ao ambiente, os taquizoítos apresentam sensibilidade também às enzimas proteolíticas do suco gástrico, sendo usualmente degradados por elas (Tenter *et al.*, 2000).

Esta forma pode medir aproximadamente de 2 a 6 µm de comprimento e possui grande número de organelas e corpos de inclusão, como conóide, róptrias, micronemas, complexo de Golgi, mitocôndria, retículo endoplasmático liso e rugoso, grânulos densos, grânulos de amilopectina (que podem estar ausentes), microtúbulos subpeliculares e apicoplasto. A película que envolve *T. gondii* é composta de três membranas, o plasmalema e duas membranas próximas, que formam o complexo interno de membrana (Dubey *et al.*, 1998), que é altamente organizado através de uma rede de microtúbulos denominada rede subpelicular (Harding & Meissner, 2014) (Esquema 3).

Os taquizoítos podem se mover por “gliding”, ondulações ou rotações, não possuindo nenhum meio de locomoção visível, como cílios, flagelos ou pseudópodes (Dubey, *et al.*, 1998). A forma de locomoção mais utilizada por *T. gondii* é o “gliding”, sendo este um movimento de deslize do parasito pelo substrato, exibindo pequenas mudanças morfológicas durante o movimento (Heintzelman, 2015).

Os taquizoítos entram na célula hospedeira através do processo de penetração ativa ou por fagocitose, sendo circundado por um vacúolo parasitóforo logo após a sua entrada no primeiro caso (Bonhomme *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1998). Na célula, o taquizoíto pode se dividir assexuadamente, através de repetidas endodiogênias, forma especializada de divisão onde a célula-mãe dá origem a duas células-filhas, sendo degradada ao final do processo. Após muitos ciclos de divisão, a célula hospedeira se rompe e libera taquizoítos no meio extracelular, que serão

capazes de infectar outras células e recomeçar o ciclo (Sheffield & Melton, 1968; Dubey *et al.*, 1998).



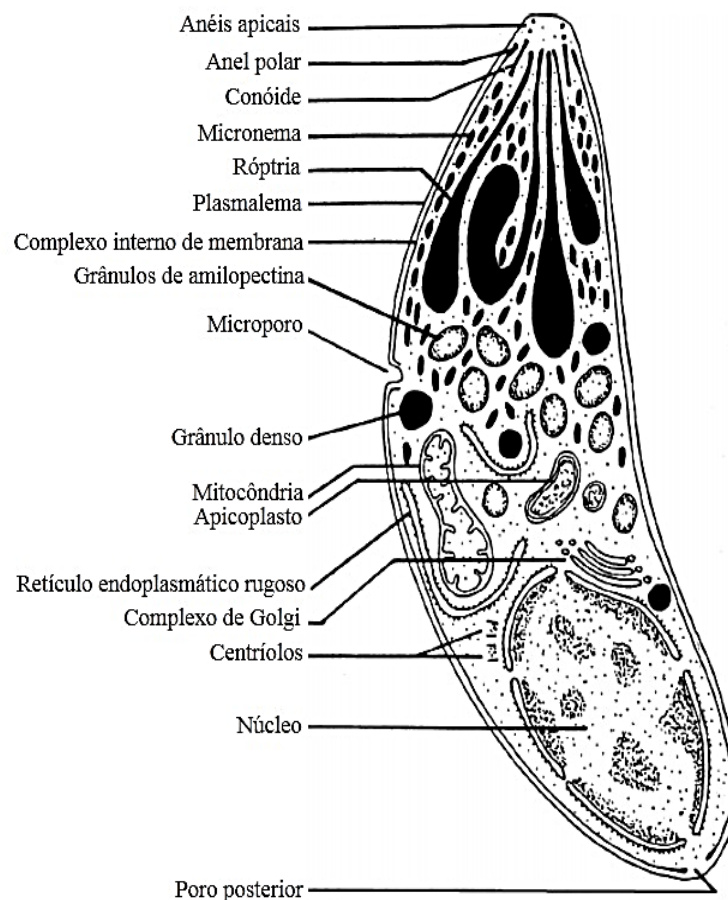
**Esquema 3. Esquema da ultraestrutura da forma taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.** A forma taquizoíto de *T. gondii* apresenta as organelas listadas estando o núcleo centralizado e tendo poucos grânulos de amilopectina, que geralmente estão ausentes nesta forma. Traduzido de Dubey *et al.* (1998).

#### 2.4.2. Bradizoítos

A forma bradizoíto (do grego, bradi = lento, esquema 4), assim como a taquizoíto, foi descrita por Frenkel (1973) tendo como característica a lenta multiplicação e a formação de cistos teciduais (Dubey *et al.*, 1998). Esta forma é estruturalmente similar à taquizoíto, porém, são funcionalmente diferentes, sendo capazes de resistir às enzimas proteolíticas do estômago do hospedeiro, o que não ocorre com os taquizoítos (Jacobs *et al.*, 1960; Dubey *et al.*, 1998).

Após 10-14 dias de infecção, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, que se dividem mais lentamente e formam cistos teciduais em diversos tecidos do corpo (Lyons *et al.*, 2002). Os cistos teciduais possuem centenas de bradizoítos e são capazes de permanecer nos tecidos do hospedeiro como uma forma latente. No entanto, estes cistos teciduais parecem não permanecer em sua forma latente durante todo o curso da infecção. Acredita-se que periodicamente os cistos teciduais se rompam, os bradizoítos liberados invadem outras células hospedeiras, se convertem em taquizoítos e podem formar novos cistos teciduais em diferentes locais mesmo em hospedeiros imunocompetentes (Skariah *et al.*, 2010). Em casos de imunodepressão ocorre a reativação da infecção e os bradizoítos recém convertidos em taquizoítos se multiplicam livremente (Montoya & Liesenfeld, 2004).

Cistos teciduais podem variar de tamanho de acordo com o tecido onde estão localizados, por exemplo, cistos localizados no cérebro podem possuir 70µm e cistos localizados no tecido muscular podem possuir 100µm. Além do cérebro e músculos, os cistos podem se desenvolver em órgãos como pulmões, fígado e rins, sendo mais prevalentes em tecidos musculares cardíaco e esquelético e tecido nervoso (Dubey *et al.*, 1998). Cistos em seu estado de latência, sem nenhuma interferência do sistema imune do hospedeiro, podem persistir durante toda a vida do hospedeiro, sem gerar nenhum tipo de resposta inflamatória (Dubey, 1988; Dubey *et al.*, 1998).



**Esquema 4. Esquema da ultraestrutura da forma bradizoíto de *Toxoplasma gondii*.** A forma bradizoíto de *T. gondii* possui as organelas listadas acima, com a presença marcante de grânulos de amilopectinas que são característicos desta forma do parasito e núcleo na região posterior. Traduzido de Dubey *et al.* (1998).

## 2.5. Tratamento para Toxoplasmose

O tratamento para Toxoplasmose humana se iniciou com a descoberta da eficácia de sulfonamidas na infecção experimental de camundongos (Sabin & Warren, 1942). Posteriormente, a combinação sinérgica de sulfonamidas com pirimetamina se mostrou eficaz (Beverley, 1973), sendo esta combinação utilizada atualmente para tratamento de toxoplasmose em humanos (Remington *et al.*, 2001). A administração destes fármacos pode gerar efeitos colaterais, como a supressão medular, ademais é contra-indicado para pacientes gestantes por ser teratogênico.

Além dos efeitos colaterais, esta combinação atua negativamente no metabolismo de ácido folínico no organismo, sendo indicado o uso simultâneo de

ácido folínico pelos pacientes a fim de reduzir os efeitos hematológicos indesejados durante o tratamento (revisto por Haverkos, 1987). Em pacientes alérgicos à sulfa, o tratamento é feito a partir do uso de clindamicina associada à pirimetamina (Dannemann *et al.*, 1992; Katlama *et al.*, 1996; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Foi descrito que o antibiótico espiamicina é um agente não-tóxico e não-teratogênico eficaz para o tratamento de gestantes (Nye, 1979), sendo esta a profilaxia alternativa utilizada 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, descreveu-se a eficácia de clindamicina no tratamento de pacientes alérgicos à sulfonamidas (McMaster *et al.*, 1973; Araujo & Remington, 1974). A posologia atualmente utilizada no tratamento de toxoplasmose a partir de sulfadiazina e pirimetamina é a seguinte:

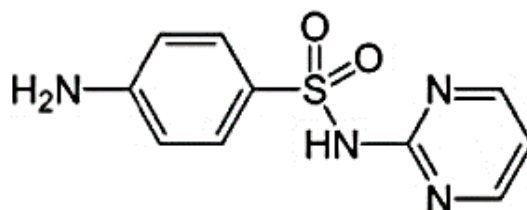
A combinação de sulfadiazina e pirimetamina é feita com a administração de 1 a 1,5g a cada 6h em adultos. Para crianças, a dosagem pode variar de 100mg/kg a 200mg/kg. A complementação com ácido folínico é feita com 5 a 10mg/dia. O tratamento pode durar de 3 a 6 semanas. Em casos de toxoplasmose congênita ou neonatal, o tratamento recomendado pode durar um ano;

Para prevenção de pacientes adultos imunodeprimidos, é indicada a utilização de 0,5g a 1g de sulfadiazina a cada 6h, combinada à 25 a 75mg/dia de pirimetamina e ácido folínico de 10 a 25mg/dia. Para crianças imunodeprimidas, a profilaxia é feita a partir da administração de 85 a 120mg/dia de sulfadiazina, associada à 1mg/kg/dia de pirimetamina, e 5mg a cada 3 dias de ácido folínico (Farmanguinhos/Fiocruz, 2006) (Ministério da Saúde, 2016).

### **2.5.1. Sulfadiazina**

As sulfadiazinas ( $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ ) (Esquema 5) se encontram dentro do grupo das sulfonamidas, sendo análogas estruturalmente e antagonistas competitivas do ácido paraminobenzóico (PABA), que é utilizado pelo parasito para a produção de ácido folínico. A sulfadiazina quando administrada em gestantes pode ter efeito teratogênico, não sendo indicada para este tipo de paciente. Caso seja necessária a utilização de sulfadiazina durante o tratamento de gestantes, sua administração não

é indicada no final do terceiro trimestre de gestação, pois pode causar o desenvolvimento de retardo mental, paralisia cerebral, surdez e paralisia nos olhos (Remington *et al.*, 2001). Quando combinada à pirimetamina, a sulfadiazina possui seu efeito aumentado em até oito vezes (Eyles & Coleman, 1955; Fayer *et al.*, 1972).

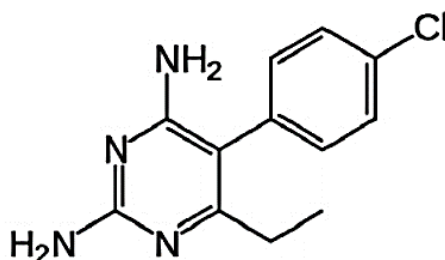


**Esquema 5. Estrutura química da Sulfadiazina** (Obtido de Al-Lohedan & Ali, 2013).

### 2.5.2. Pirimetamina

A Pirimetamina ( $C_{12}H_{13}ClN_4$ ) (Esquema 6) foi inicialmente desenvolvida como uma droga antimalárica por Falco *et al.*, (1951). Hitchings *et al.*, (1952) descreveram que a administração de altas doses de pirimetamina produzia sinais de deficiência de ácido folínico em ratos. Thiersch (1954) descreveu que a utilização de pirimetamina em ratas grávidas poderia causar o nascimento de fetos com baixa estatura ou com más-formações, indicando que deficiências nos níveis de ácido folínico no organismo podem possuir efeito teratogênico.

Em infecções por toxoplasmose, a pirimetamina possui atividade microbica, atuando na inibição da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) e consequentemente, na produção de ácido folínico pelo parasito, prejudicando a síntese de seu DNA e RNA (Beverley & Fry, 1957; Aspinalli *et al.*, 2002).



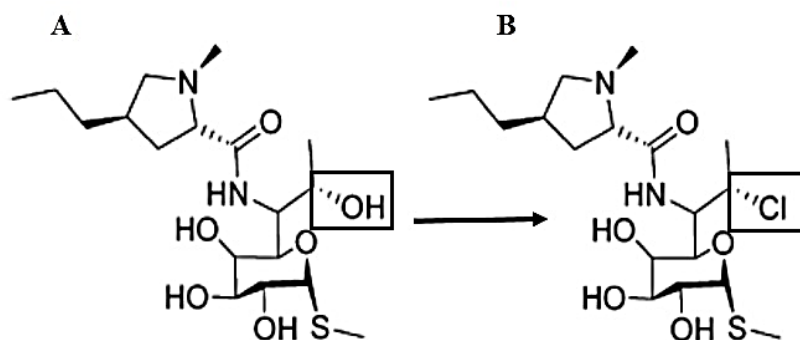
**Esquema 6. Estrutura Química da Pirimetamina** (Obtido de Perold *et al.*, 2014).



#### 2.5.4. Clindamicina

A clindamicina ( $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$ ) (Esquema 8) foi primeiramente descrita por McMaster e colaboradores (1973). É um antibiótico produzido a partir da lincomicina, através da substituição do grupamento hidroxila presente em sua estrutura por uma molécula de cloro. Esta modificação tornou este fármaco um potente antimalárico, além de aumentar sua atividade antibacteriana (Tabbara *et al.*, 1974). A clindamicina é um fármaco utilizado alternativamente à sulfadiazina e à pirimetamina, em casos de infecção por *T. gondii*. Sua administração é aconselhável para pacientes alérgicos à sulfadiazina (Rolston, 1991).

Araujo & Remington (1974) descreveram que a clindamicina é capaz de reduzir a transmissão congênita quando a gestante se encontra na fase aguda da doença, assim como a formação de cistos teciduais durante a fase crônica. No entanto, este mesmo estudo demonstra que a clindamicina não é capaz de reduzir a carga parasitária no cérebro, já que o fármaco é absorvido em pequenas concentrações pelo tecido nervoso. Em casos de desenvolvimento de lesões oculares, a administração de clindamicina apresenta grande eficácia, quando comparada à sulfadiazina combinada à pirimetamina (Tabbara & O'Connor, 1980).



**Esquema 8. Substituição do grupamento hidroxila por uma molécula de cloro na produção de clindamicina. A) Estrutura química da Lincomicina. B) Estrutura química da Clindamicina. Adaptado de Morar *et al.* (2009).**

## 2.6. Melatonina

Melatonina (MELAS = escuro e TONEIN = secretora) é uma molécula altamente conservada, presente em praticamente todas as espécies, abrangendo desde as arqueobactérias aos vertebrados mais complexos. Essa molécula foi descoberta por Lerner *et al.* (1958) sendo descrita primeiramente como N-acetil-5-metoxitriptamina (Bagnaresi *et al.*, 2012). Além de possuir papel importante na regulação do ciclo circadiano e do sono (Zhang & Zhang, 2014) a melatonina possui também propriedades antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras (Vielma *et al.*, 2014).

Este hormônio é produzido majoritariamente na glândula pineal, localizada na parte central do cérebro. Outros sítios de produção de melatonina foram descritos, os quais incluem a retina (Cardinali & Rosner, 1971, Tosini & Menaker, 1998), o trato gastrointestinal (Raikhlin & Kvetnoy, 1976; Bubenik, 2002), a pele (Slominski *et al.*, 2005), linfócitos (Carrilo-Vico *et al.*, 2004) e medula óssea (Conti *et al.*, 2000). A meia vida da melatonina está dividida em duas partes, em um padrão denominado biexponencial, com a primeira parte com duração em torno de dois minutos e a segunda parte durando aproximadamente 20 minutos (Claustrat & Letron., 2005). Melatonina também possui a capacidade de proteger o organismo contra infecções por vírus, bactérias e protozoários (Srinivasan *et al.*, 2010).

Foi descrito que há três tipos de receptores para melatonina: dois envolvidos com a regulação do sono, MT1 e MT2, e um terceiro que está envolvido com o estresse oxidativo, o MT3. Os receptores MT1 e MT2 são encontrados em sua maioria no núcleo supraquiasmático e pertencem à família dos receptores de membrana acoplados à proteína G, ligados à inibição da enzima adenil-ciclase e à redução subsequente de AMP-cíclico (Carlson *et al.*, 1989; Reppert *et al.*, 1994; Dawoodi *et al.*, 2012). O terceiro receptor, MT3, foi descrito em roedores como análogo humano da enzima citoplasmática quinolona-redutase 2, que participa da proteção contra estresse oxidativo (Dawoodi *et al.*, 2012).

### 2.6.1. A glândula pineal

A glândula pineal, também chamada de epífise, foi primeiramente descrita no século três por Herófilo, médico anatomista grego, que a definiu como um esfíncter

capaz de regular o fluxo de pensamentos no sistema ventricular do cérebro. Após 450 anos da primeira observação, Galeno, médico e filósofo grego, observou que a estrutura da glândula pineal apresentava diferenças quando comparada ao tecido nervoso, mas apresentava semelhanças em relação a outros tecidos (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

No século 17, a glândula foi estudada pelo filósofo e matemático francês Descartes, que a descreveu como um “terceiro olho” (Berhouma, 2013). Nesta época, não havia o conhecimento das funções fisiológicas da glândula pineal, sendo, portanto, descrita como o local no corpo humano onde a alma se ancorava (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

### **2.6.2. Ciclo Circadiano**

O ciclo circadiano (do latim, *circa* = aproximadamente, *diem* = dia) é essencial para células vivas (Reddy & O'Neill, 2009). Este ciclo é responsável pela organização temporal de grande variedade de funções, como a regulação da temperatura corporal, pressão sanguínea e liberação de hormônios (McMahon *et al.*, 2014).

Em mamíferos, o ciclo circadiano é como o relógio central do cérebro, tendo a função de manter o ritmo diário de acordo com os estímulos ambientais (Robinson & Reddy, 2014). O principal regulador destes ritmos é o núcleo supraquiasmático (NSQ), fazendo com que o sistema nervoso central seja um coordenador para o resto do corpo (Janich, *et al.*, 2014, Robinson & Reddy, 2014). As atividades metabólicas do NSQ possuem maior atividade durante o dia e são reduzidas durante a noite. No entanto, esta atividade noturna pode ser aumentada quando há exposição à luz (Robinson & Reddy, 2014). Durante o período noturno, a produção de melatonina pode ser reduzida caso haja alguma exposição à luz, mesmo em pequena quantidade, levando ao rápido declínio de suas concentrações (Vanecek, 1998). Quando o ciclo circadiano é interrompido, seja por fatores genéticos ou ambientais, podem ocorrer diversas alterações em processos fisiológicos. A ligação entre a fisiologia circadiana e outros processos fisiológicos possuem implicação direta na biologia humana, que podem potencializar, por exemplo, a susceptibilidade a doenças (Takahashi *et al.*, 2008).

### 2.6.3. Biossíntese de Melatonina

A biossíntese de melatonina é controlada pelo NSQ, que transfere as informações diferenciadas entre as fases claras e escuras para a glândula pineal, regulando a produção de melatonina (Bagnaresi *et al.*, 2012). A melatonina é molécula altamente hidrofílica, sendo rapidamente metabolizada no fígado e excretada pela urina (Simonneaux & Ribelayga, 2003). A quantidade encontrada no plasma sanguíneo, em condições normais e durante o ciclo de escuro, é de aproximadamente 100 pM (Reiter, 1981).

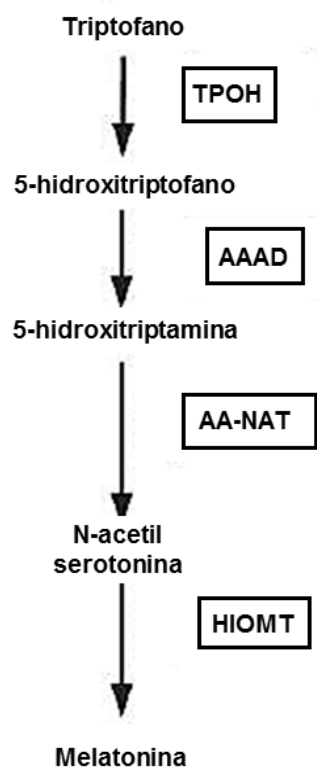
A síntese de melatonina é majoritariamente regulada pelo NSQ, que atua em sincronia com os ciclos claro/escuro ambientais através de uma comunicação neural direta com a retina (Repert & Weaver, 2002). Esta última é responsável por receber a informação luminosa vinda do ambiente e a envia para o NSQ via trato retino-hipotalâmico (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Estes sinais induzem a liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA), sendo responsável pela produção de melatonina durante a fase de escuro. Na fase clara, o GABA envia um sinal inibitório para o NSQ que por sua vez reduz a produção de melatonina pela glândula pineal (Kalsbeek *et al.*, 2000).

A biossíntese de melatonina ocorre nas células da glândula pineal, os pinealócitos, a partir da captura do aminoácido triptofano, encontrado livre na corrente sanguínea, o qual é convertido em 5-hidroxitriptofano (TPOH) (Esquema 9).

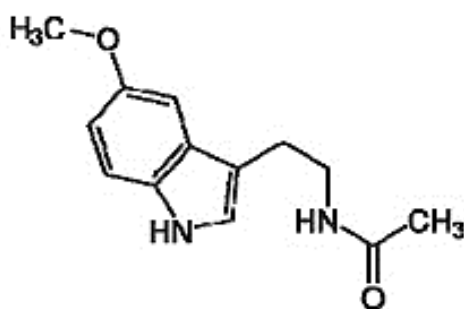
Este produto é descarboxilado pela descarboxilase de ácidos aromáticos (AAAD) a 5-hidroxitriptamina (5-HT), sendo também conhecida como serotonina.

A serotonina é N-acetilada e se converte em N-acetilserotonina (NAS) pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Esta enzima é responsável por ativar a glândula pineal durante a noite, caracterizando esta fase como fase escura.

Durante a fase escura, a NAS é metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), formando o produto final N-acetil-metoxitriptamina, a melatonina (MEL) (Axelrold, 1960; Reiter *et al.*, 2004; Bagnaresi *et al.*, 2012) (Esquemas 9 e 10).



**Esquema 9. Esquema da síntese de melatonina a partir do aminoácido triptofano.** O triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (TPOH). Logo após, há a formação de 5-hidroxitriptamina (serotonina) a partir do TPOH, a qual é acetilada para a formação de N-acetilserotonina (NAS). Posteriormente, a NAS é metilada resultando na formação de melatonina (MEL). Adaptado de Simonneaux & Ribelayga (2003).



**Esquema 10. Estrutura química da melatonina.** Obtido de Di Bella *et al.* (2013).

## 2.6.4. Quimioterapia com Melatonina

### 2.6.4.1. Plasmodiose e Melatonina

A malária é doença infecciosa que acomete cerca de 200 milhões de pessoas em todo o mundo (Childs & Buckee, 2015). A forma mais virulenta da doença é

transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles*, o qual transporta em suas glândulas salivares o parasito *Plasmodium* spp., sendo potencialmente fatal em curto período de tempo (Bagnaresi *et al.*, 2012).

A melatonina é capaz de inibir os radicais livres produzidos durante o processo de apoptose de células hepáticas induzidas pela infecção do parasito através de um caminho mitocôndria-dependente. Estes dados sugerem que a melatonina é uma molécula com efeitos antioxidantes, pois pode modular, por exemplo, a enzima superóxido dismutase (SOD), e consequentemente a produção de radicais livres, protegendo o fígado das injúrias causadas pelos processos de apoptose celular (Srinivasan *et al.*, 2010).

Bagnaresi *et al.* (2012) descreveram que a melatonina é capaz de modular a fisiologia do parasito e, consequentemente, seu desenvolvimento. Este hormônio é capaz de regular processos fundamentais para o parasito que envolvem  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e sinalização através de AMP-cíclico, como alteração da diferenciação e divisão celular, organização do citoesqueleto e apoptose (Gazarini & Garcia, 2014).

Para *Plasmodium chabaudi chabaudi*, característico de roedores, os estudos demonstram que a melatonina é capaz de sincronizar a infecção através da modulação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sugerindo sua participação nos mecanismos de sinalização utilizados por este hormônio. Em contraste, para *Plasmodium berghei* e *Plasmodium yoelii*, a melatonina mostrou-se incapaz de sincronizar a infecção devido à ausência de resposta destes parasitos à melatonina (Bagnaresi *et al.*, 2009).

#### **2.6.4.2. Tripanossomíase e Melatonina**

*Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, que acomete aproximadamente de 8 a 12 milhões de pessoas nos países latino-americanos (Gürtler & Yadon, 2015). Foi descrito que em torno de 30-35% dos casos de doença de Chagas resultam em infecção crônica, sendo este tipo de infecção assintomática na maioria das vezes (Álvarez *et al.*, 2014). Em casos graves, a infecção crônica pode gerar o desenvolvimento de cardiomiopatia, a qual resulta no aumento do músculo cardíaco, além de fibrose do tecido que o compõe. Estes sintomas podem levar o paciente infectado a óbito (Oliveira *et al.*, 2013).

Estudos recentes indicam a eficácia da melatonina como possível quimioterápico em casos de cardiomiopatia resultante de infecção crônica. Em ratos este hormônio é capaz de diminuir a carga parasitária durante as fases aguda e crônica da doença (Santello *et al.*, 2007) e reduzir o processo inflamatório causado durante o processo cardiomiopático (Oliveira *et al.*, 2013). Além disto, a melatonina mostrou-se capaz de reduzir o estresse oxidativo gerado pelo dano ao músculo cardíaco (Cardinali & Alvarez, 2011) e a atividade da enzima óxido nítrico sintase-induzível, regulando positivamente o sistema imune do hospedeiro através do aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-2 (Santello *et al.*, 2007; Bagnaresi *et al.*, 2012).

#### **2.6.4.3. Leishmaniose e Melatonina**

Leishmaniose é a infecção causada pelo parasito protozoário do gênero *Leishmania*, sendo endêmica em áreas rurais e países tropicais e subtropicais (Clem, 2010). *Leishmania infantum* é o protozoário causador da leishmaniose visceral, afetando cerca de 400 mil novas pessoas a cada ano. Esse tipo é o mais grave de leishmaniose em termos de mortalidade. Os sintomas que compõem a leishmaniose visceral são dor de cabeça, febre, diarreia, esplenomegalia, hepatomegalia, entre outros (Khadem & Uzonna, 2014).

Elmahallawy *et al.* (2014) demonstraram a atividade *in vitro* exercida pela melatonina em promastigotas de *Leishmania infantum*. Alterações mitocondriais geradas pelas mudanças na distribuição de  $\text{Ca}^{2+}$  foram visualizadas, além de aumentar a produção de radicais livres (ROS) devido à inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, podendo levar o parasito à morte por apoptose através de um caminho mitocôndria-dependente. Ademais, demonstrou-se redução drástica do complexo II da cadeia transportadora de elétrons, levando à disfunção mitocondrial (Elmahallawy *et al.*, 2014). Melatonina também foi capaz de aumentar a produção de nitrito intracelular, acarretando na inibição do crescimento ou morte parasitária (Elmahallawy *et al.*, 2014).

#### **2.6.4.4. Toxoplasmose e Melatonina**

Melatonina é um hormônio que possui efeitos diretos e indiretos no sistema imune, especialmente na imunidade mediada por células (Poon *et al.*, 1994). Além disso, a melatonina é capaz de aumentar a absorção de zinco e através disto regular seus níveis no organismo. A má regulação ou a deficiência de zinco no organismo são causas comuns de doenças relacionadas ao sistema imune, sendo esta molécula de extrema importância para o desenvolvimento da imunidade. A melatonina é capaz de aumentar a absorção de zinco no organismo, reduzindo os riscos de doenças relacionadas ao sistema imune (Baltaci *et al.*, 2003; 2004; 2005).

Em casos de infecção por *T. gondii*, a imunidade celular envolvendo células efectoras como macrófagos ativados pelos produtos de linfócitos T é o mecanismo primário para combatê-la, por isso, é de extrema importância a regulação dos níveis de zinco no organismo de pacientes infectados. A administração de zinco, melatonina, ou zinco conjugado à melatonina em camundongos infectados por *T. gondii* aumentou significativamente o número de linfócitos T CD4+ efetores e T CD8+ reguladores, garantindo o correto funcionamento deste primário mecanismo de defesa contra o parasito (Baltaci *et al.*, 2003). Baltaci *et al.* (2005) também descreveram que na ausência da glândula pineal há redução significativa nos níveis de zinco (consequentemente, do hormônio timulina), número de células T, e atividade de células “natural killer” (NK). Estas deficiências podem ser revertidas através da administração de melatonina (Del Gobbo *et al.*, 1989, Baltaci *et al.*, 2005).

#### **2.7. Morte celular**

A morte de células é um processo natural e essencial durante o desenvolvimento e homeostasia dos organismos multicelulares regulando a produção de células viáveis e suas funcionalidades (Henriquez *et al.*, 2008). Existem basicamente três tipos de morte celular programada: apoptose (MCP I), autofagia (MCP II) e necrose (MCP III), que se diferenciam principalmente pelas alterações morfológicas ocasionadas durante os processos (Henriquez *et al.*, 2008). A apoptose é a principal forma de eliminação de células através de morte programada, com a ativação de caspases e formação de corpos apoptóticos. A necrose, que era considerada um tipo de morte ao acaso, atualmente tem sido considerada, em

certos casos, um tipo de morte celular programada, com a ativação de resposta inflamatória no organismo hospedeiro, como o inflamassoma (Zamboni *et al.*, 2015). A autofagia tem sido descrita como um tipo de morte celular programada não-apoptótica, que ocorre em casos de estresse celular por privação de nutrientes, por exemplo (Edinger & Thompson, 2004).

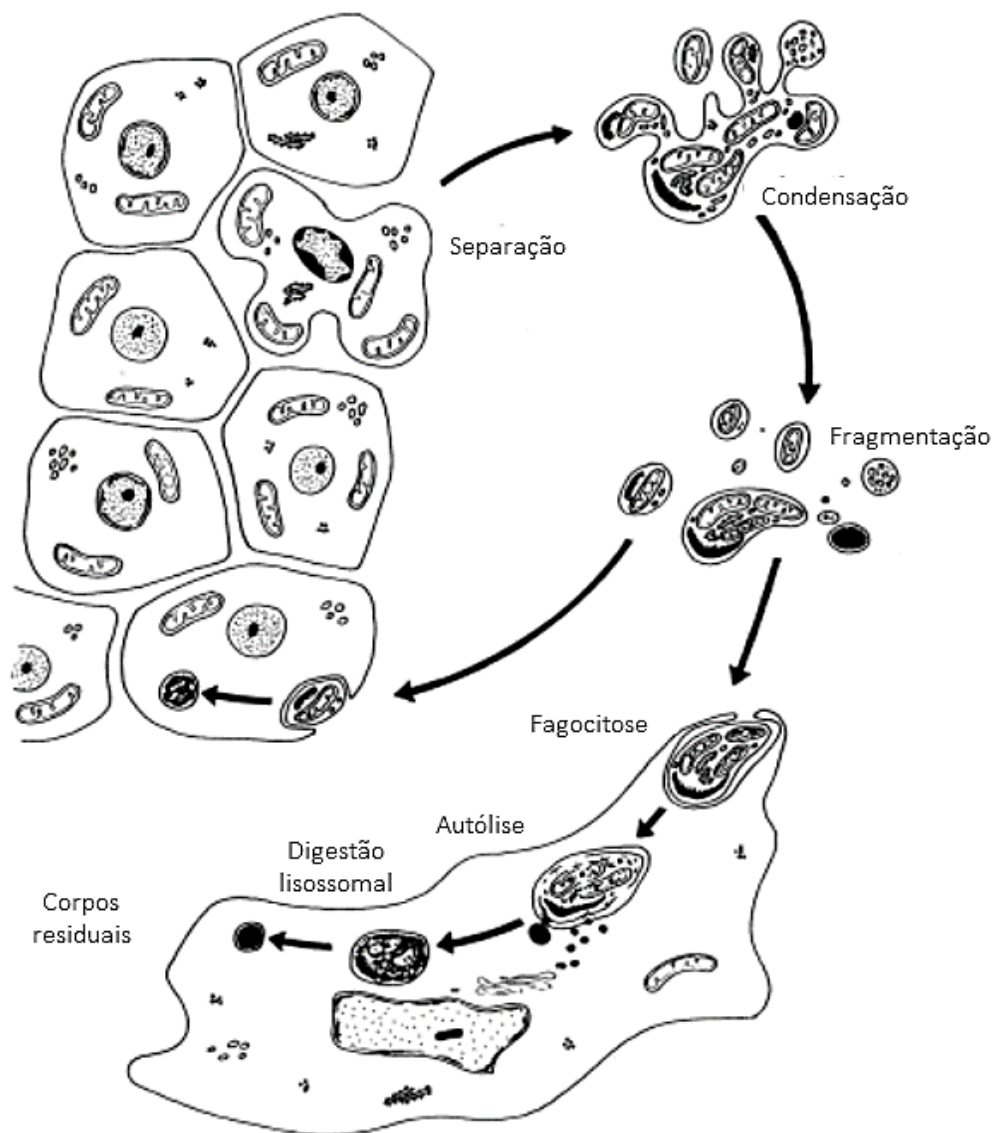
### **2.7.1. Apoptose**

A morte celular é um processo fundamental para a regulação de sistemas vivos. A apoptose (Esquema 11) é chamada de morte celular programada, termo utilizado para a morte previsível de células em um organismo (Jacobson *et al.*, 1997) que envolve a ativação de maquinaria intracelular altamente conservada ao longo da evolução (Vermeulen *et al.*, 2005). Este processo foi primeiramente descrito como uma série de mudanças morfológicas que possuíam papel fundamental para o seu entendimento. Inicialmente, a morfologia das células é mantida, ocorrendo alterações a partir do DNA da célula, até a total fragmentação celular (Wyllie *et al.*, 1980). A fragmentação do DNA genômico é a principal característica do processo de apoptose. Estes fragmentos são gerados a partir da atividade de nucleases (Loo, 2011) e podem ser facilmente detectados com o uso de kit comerciais, geralmente chamados de “Tunel”.

A apoptose é caracterizada por afetar células individuais, sem causar resposta inflamatória, e é manifestada pela formação de pequenos corpos esféricos, denominados corpos apoptóticos que contém conteúdo celular, como organelas, envolto pela membrana plasmática. As mudanças estruturais durante a apoptose se dividem em duas etapas, sendo a primeira com a formação dos corpos apoptóticos, e na segunda a fagocitose dos corpos apoptóticos e sua degradação dentro de outras células (Kerr *et al.*, 1972).

Todos os sinais que envolvem o processo de apoptose resultam de uma cascata de sinalização, que envolvem principalmente a ativação de proteases, as caspases, responsáveis por clivar diferentes proteínas localizadas em diferentes compartimentos celulares (Vermeulen *et al.*, 2005). Caspases são enzimas proteolíticas que tem a principal função no controle de morte celular e resposta inflamatória (Shalini *et al.*, 2014). Baseadas nas suas funções, as caspases em

mamíferos podem ser divididas em caspases 2, 3, 7, 8, 9 e 10 que são classificadas como caspases com função durante a apoptose. Caspases 1, 4, 5, 11 e 12 são classificadas como caspases com papel na resposta inflamatória no organismo hospedeiro (Shalini *et al.*, 2014).

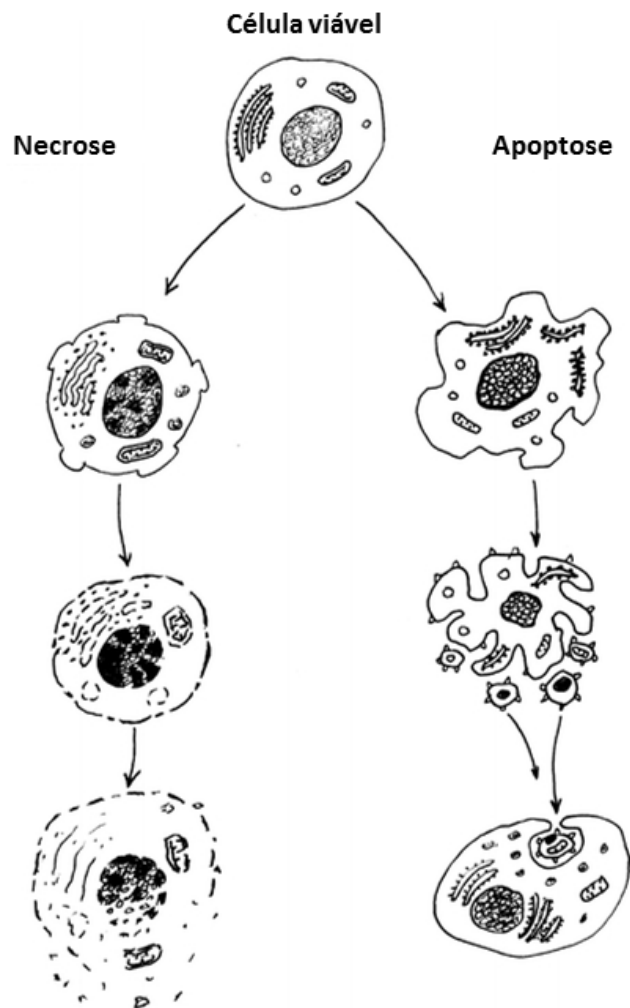


**Esquema 11. Diagrama ilustrando as etapas que se desenvolvem durante o processo de morte celular programada (apoptose).** A apoptose se inicia com a separação da célula que passará pelo processo de morte celular, seguido da condensação do seu conteúdo, fragmentação e formação de corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos serão fagocitados por outra célula, autolisados e digeridos por lisossomos, ocorrendo a formação de pequenos corpos residuais ao final do processo. Traduzido de Kerr *et al.* (1972).

### 2.7.2. Necrose

Em contraste à apoptose, a necrose (Esquema 12) é conhecida como morte celular passiva (Edinger & Thompson, 2004). A morte celular ocasionada pela necrose já foi considerada acidental, devido a ações que não eram de controle próprio da célula em questão. Porém, estudos recentes indicam que assim como a apoptose a necrose é um tipo de morte celular programada, podendo ser ativada pela célula em resposta a estímulos em qualquer momento do seu desenvolvimento, quando outro mecanismo de morte celular, por exemplo, não é bem-sucedido (Edinger & Thompson, 2004; Henriquez *et al.*, 2008).

A necrose é o resultado final da desorganização bioenergética, resultando na redução da produção de ATP a um nível extremo, impossibilitando a sobrevivência celular (Edinger & Thompson, 2004). A necrose é um tipo de morte celular que se diferencia da apoptose por vários quesitos, sendo os processos morfológicos bem marcantes durante seu curso. Durante a necrose, ocorre o rompimento da membrana celular, extravasamento do conteúdo celular e a degradação do material genético ao longo do processo (Henriquez *et al.*, 2008). No processo de necrose, há a formação de exsudato inflamatório. Durante a morte celular por necrose pode-se observar alterações celulares que incluem o inchaço da mitocôndria e a alteração da matriz mitocondrial, rompimento da membrana nuclear, de organelas e membrana celular, além da degradação dos ribossomos e lisossomos. Os fragmentos formados ao final do processo são degradados por outras células fagocíticas especializadas. A necrose resulta de injúrias causadas por agentes externos, como toxinas, que afetam diretamente um grupo de células, ou por algum tipo de estresse físico, como danos à membrana celular, podendo levar à perda da homeostase (Wyllie *et al.*, 1980 Henriquez *et al.*, 2008).



**Esquema 12. Diagrama ilustrando as diferenças entre os tipos de mortes celulares necrose e apoptose.** Durante a necrose (esquerda), há o rompimento da membrana celular e o extravasamento de seu conteúdo citoplasmático, que será degradado ao final do processo. Durante a apoptose (direita) a morte celular se inicia com a condensação das organelas, da membrana celular e do material genético, ocorrendo a formação de corpos apoptóticos que serão degradados por outras células ao final do processo. Adaptado de Van der Meer *et al.* (2010).

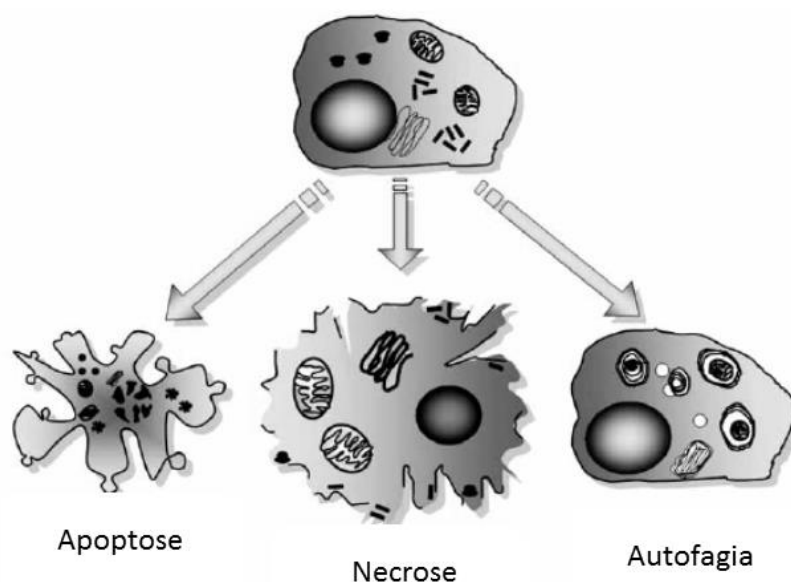
### 2.7.3. Autofagia

Além da apoptose e da necrose, a autofagia (Esquema 13) também é considerada um tipo de morte celular programada, porém, está relacionada à ausência de nutrientes para a célula, sendo considerado um processo de proteção e adaptação celular. Em alguns casos, a autofagia é etapa fundamental no processo de morte celular, podendo ocorrer antes da apoptose (Mariño *et al.*, 2014). Isto se

deve ao fato de que a maioria das células que estão em processo de autofagia terá como próximo passo a apoptose (Edinger & Thompson, 2004).

Em casos de doenças como Alzheimer e Parkinson observa-se grande número de células em processo de autofagia, indicando que esse processo não é somente para a manutenção celular devido à ausência de nutrientes, mas é, também, um processo de morte celular programada (Edinger & Thompson, 2004).

A principal característica da autofagia é a formação de autofagossomos no citoplasma da célula que irão se fundir com lisossomos para a formação de autofagolisossomos. Estes autofagolisossomos contêm componentes encontrados no citoplasma da célula, como organelas, que serão degradados para a obtenção de energia e manutenção do metabolismo celular (Henriquez *et al.*, 2008).



**Esquema 13. Diagrama ilustrando os três tipos de morte celular programada: apoptose, necrose e autofagia.** Durante a apoptose, ocorre condensação da membrana celular e de seu conteúdo, ocorrendo a formação de corpos apoptóticos que serão degradados por outras células. O processo de necrose se inicia com o rompimento da membrana plasmática, havendo o extravasamento do conteúdo celular que será digerido por células fagocíticas. Na autofagia, ocorre a formação de autofagolisossomos que contém conteúdo citoplasmático, como organelas, que serão digeridos para a obtenção de energia. Traduzido de Henriquez *et al.* (2008).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Verificar a possível ação anti-toxoplasma de melatonina na infecção por *T. gondii*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Analisar se o tratamento com melatonina altera o crescimento de *T. gondii* em células hospedeiras LLC-MK2;
- Verificar o possível tipo de morte celular de *T. gondii* em LLC-MK2;
- Avaliar a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados por *T. gondii* tratados com melatonina.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Células LLC-MK2**

Células epiteliais de rins de macaco *Rhesus* (linhagem LLC-MK2), foram cedidas pelo professor Wanderley de Souza (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ). As células foram mantidas em frascos de culturas de células de 25 cm<sup>2</sup> com meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - DIFCO) em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Células LLC-MK2 em confluência foram utilizadas para os experimentos. Tripsina foi adicionada ao frasco de cultura e incubada por 5 minutos para liberação das células do substrato. DMEM suplementado com 10% de SFB foi adicionado e as células quantificadas em Câmara de Neubauer. Em placa de 24 poços contendo lamínulas estéreis, adicionou-se 150µl da solução contendo 1 x 10<sup>5</sup> células. A placa foi mantida na estufa para a adesão das células à lamínula durante 1h. A placa foi lavada com solução de Hanks para a retirada de células não aderidas. As células foram cultivadas em 200µl do meio de cultura por poço durante 24h na estufa.

### **4.2. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii***

Taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) foram mantidos por inóculos na cavidade peritoneal de camundongos durante 2 ou 3 dias. Após este período, foi realizada lavagem da cavidade peritoneal dos camundongos utilizando solução salina tamponada de fosfato (PBS) obtendo-se taquizoítos de *T. gondii*. A solução contendo taquizoítos de *T. gondii* foi centrifugada por 10 min a 500 g. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de DMEM e a quantidade de parasito foi quantificada em Câmara de Neubauer. O projeto foi submetido ao Comitê de ética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em 12 de dezembro de 2015, ID 124396.

### **4.3. Interação parasito-célula hospedeira**

Dez taquizoítos por célula foram adicionados às LLC-MK2 e incubados por 1h em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com meio DMEM para a

retirada de parasitos que não penetraram nas células. Então foi adicionada solução de tratamento contendo melatonina.

#### **4.4. Tratamento com melatonina**

A melatonina foi diluída em meio de cultura DMEM em uma concentração de 3mM (Sigma Aldrich, EUA) e filtrada para obtenção de solução estéril (filtro 0,22  $\mu$ m estéril). Após a interação, cada poço contendo lamínulas com células em confluência recebeu 500 $\mu$ l de meio com melatonina a 3mM. Após 24h, 48h e 6 dias as células foram lavadas e fixadas com formaldeído 4% em PBS. Células controle infectadas não receberam tratamento com melatonina.

#### **4.5. Preparo de amostras para microscopia óptica de luz e obtenção de índice de infecção pós-tratamento.**

Após infecção, as lamínulas contendo as células fixadas foram coradas com solução de Giemsa a 10% em água e desidratadas em soluções acetona/xilol. Após a desidratação, as lamínulas foram montadas sobre lâminas com Entellan para posterior observação em microscópio óptico. A obtenção do índice de infecção foi feita a partir da contagem de 300 células hospedeiras, com base na multiplicação da percentagem de células infectadas com o número médio de parasitos por célula infectada.

#### **4.6. Ensaio para apoptose por técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)**

Células LLC-MK2 aderidas às lamínulas foram infectadas por taquizoítos de *T. gondii* e tratadas ou não com melatonina. As células foram lavadas com PBS, fixadas por 1h em solução contendo 4% de formaldeído recém-preparado em tampão PHEM (60 mmol L<sup>-1</sup> Pipes, 20 mmol L<sup>-1</sup> Hepes, 10 mmol L<sup>-1</sup> EGTA, 5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, e 70 mmol L<sup>-1</sup> KCl, pH 7.2). Posteriormente foram lavadas, permeabilizadas em etanol resfriado durante 10 minutos e processada como recomendado pelo Kit *Alexa-Fluor 488 Click-it TUNEL* (Molecular Probe, EUA). As células foram visualizadas no microscópio confocal à laser LSM-710, Zeiss, da

UEZO. O kit de TUNEL adiciona dUTPs marcados com Alexa 488 à porção 3' terminal dos fragmentos permitindo determinar se a células sofreram apoptose.

#### **4.7. Preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura**

Lamínulas contendo células LLC-MK2 infectadas por *T. gondii*, tratadas ou não com melatonina, foram fixadas durante 1h em 4% de formaldeído recém-preparado, 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. As células foram desidratadas em acetona, secas por ponto crítico de CO<sub>2</sub> e montadas em “stubs”. A organização interna das células foi revelada através da retirada da parte superior das células com a utilização de fita adesiva. As amostras foram metalizadas com ouro por pulverização catódica (25 nm de espessura) e analisadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL 6490 JSM LQ da UEZO.

#### **4.8. Preparo de amostras para microscopia eletrônica de transmissão**

Para microscopia eletrônica de transmissão, a infecção e o tratamento foram realizados em garrafas de cultura de células. Ao final do tratamento, o material foi fixado com as mesmas soluções utilizadas para microscopia eletrônica de varredura (item 4.7). As células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio por 40 minutos protegido da luz. As células foram lavadas, desidratadas em acetona e imersas em resina epon. A resina foi polimerizada durante 48h em estufa a 60°C. O contraste das amostras foi feito em secções ultrafinas com acetato de uranila e citrato de chumbo para visualização ao microscópio eletrônico de transmissão Fei Spirit 120kv, UEZO.

#### **4.9. Teste *in vivo***

Os camundongos Balb/C (Biotério – UEZO) foram infectados com  $1 \times 10^5$  taquizoítos de *T. gondii* por inoculação intraperitoneal. Grupos de cinco animais foram tratados com 50mg/kg de melatonina ou 100mg/kg de sulfadiazina em PBS administradas diariamente por injeção intraperitoneal. Os animais do grupo controle de camundongos infectados por *T. gondii*, contendo quatro animais, receberam PBS

puro. A sobrevivência foi acompanhada diariamente. Animais achados em estado moribundo foram sacrificados com CO<sub>2</sub>.

#### **4.10. Análise dos dados**

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de Student e análise de variância (ANOVA) para comparação de valores, sendo  $P < 0,05$  considerado significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Controle do crescimento de *Toxoplasma gondii* em LLC-MK2 por melatonina

Crescimento de *T. gondii* nas células LLC-MK2 infectadas foi avaliado qualitativamente após coloração com Giemsa no microscópio óptico. Nas células sem tratamento com melatonina houve proliferação de *T. gondii* (Figura 1 A, C), com grande número de células hospedeiras rompidas após o sexto dia de infecção (Figura 1 E). Células que passaram por tratamento com melatonina demonstraram redução no crescimento de *T. gondii* (Figura 1 B, D), com preservação das células hospedeiras após 6 d de infecção (Figura 1 F).

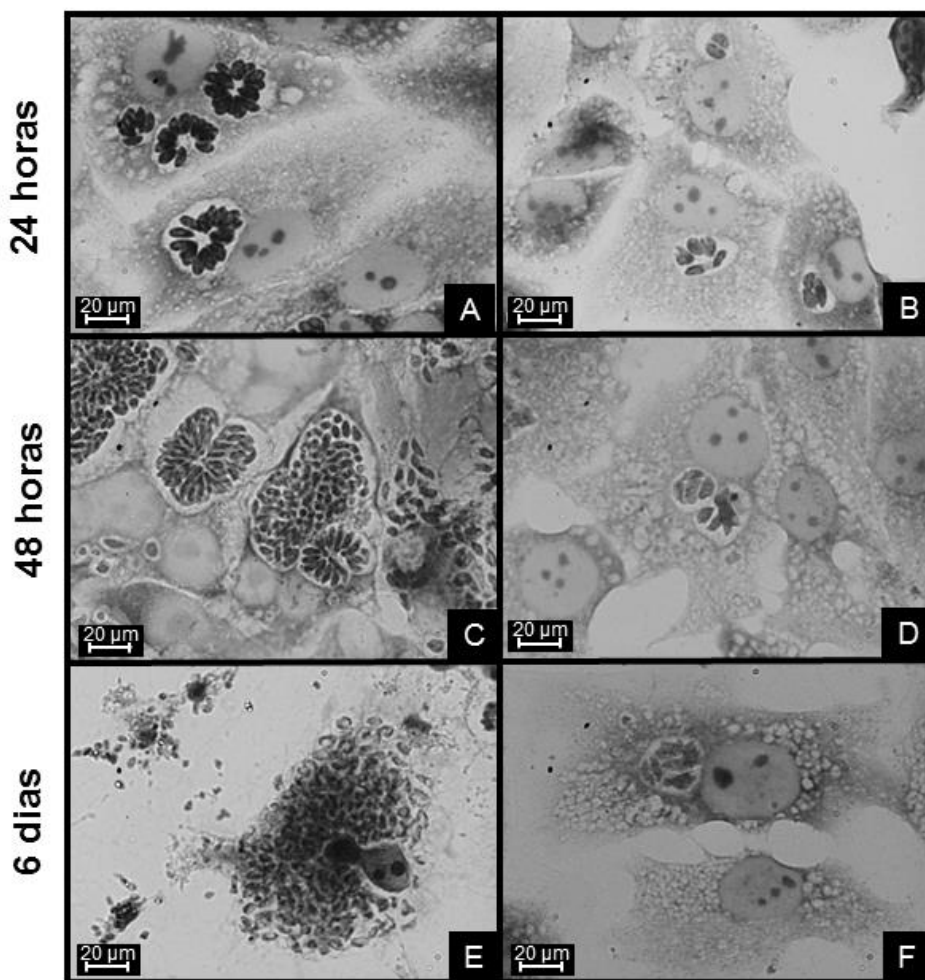


Figura 1. Imagens de campo claro de células LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii*, tratadas ou não com melatonina após 24h, 48h e 6 dias de infecção. A, C e E. Imagens de células sem tratamento com melatonina (controle), após 24h, 48h e 6 dias de infecção, respectivamente. B, D e F. Imagens de células tratadas com melatonina após 24h, 48h e 6 dias de infecção, respectivamente. As amostras foram visualizadas em aumento de 100x.

## 5.2. Índice de infecção de células LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii* tratadas ou não com melatonina

Para verificar se o tratamento com melatonina foi capaz de reduzir significativamente o índice de infecção, o crescimento do parasito em células hospedeiras infectadas e tratadas ou não com melatonina foi quantificado em microscópio óptico após coloração com Giemsa. O índice de infecção em células não tratadas com melatonina foi crescente em relação ao tempo de infecção (Figura 2). Células tratadas com melatonina apresentaram índice de infecção significativamente menor do que as sem tratamento, e redução expressiva após 6 dias (Figura 2).

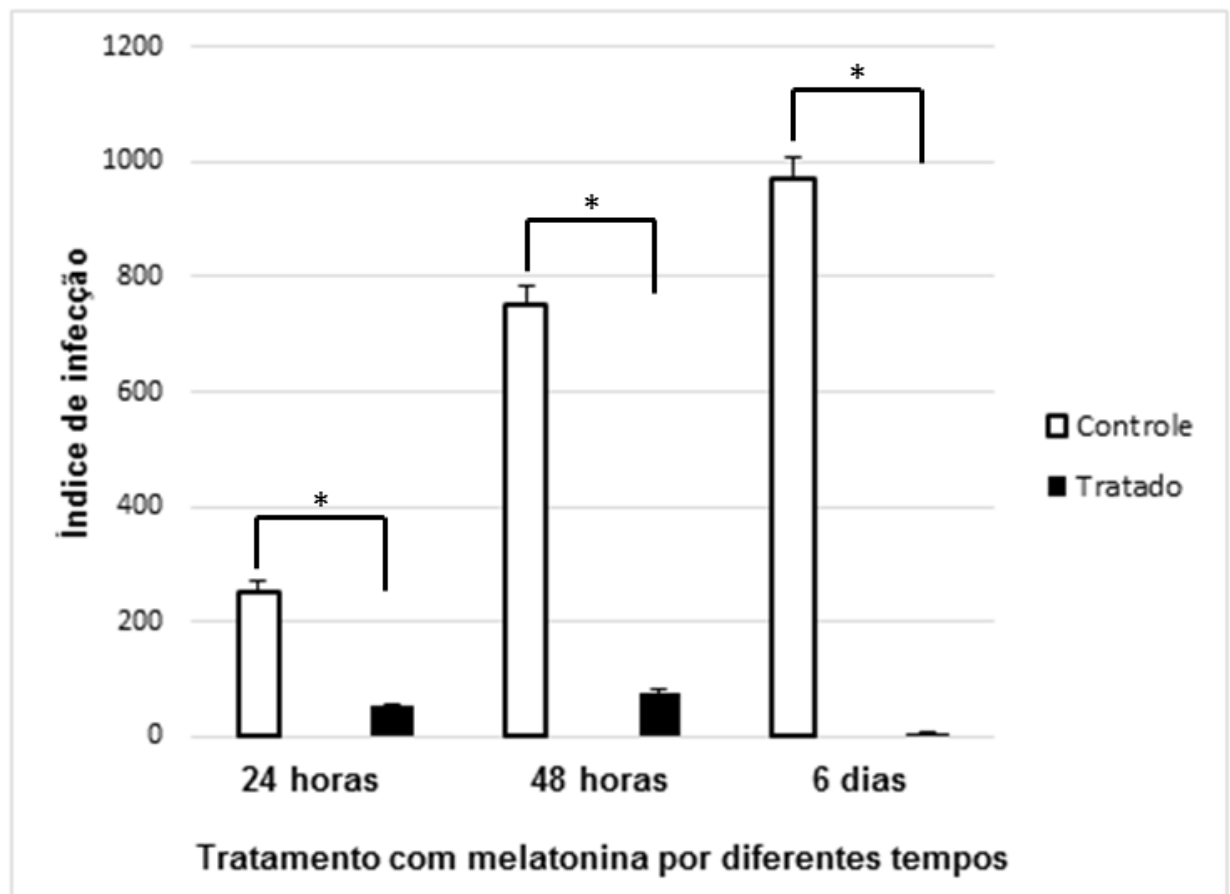
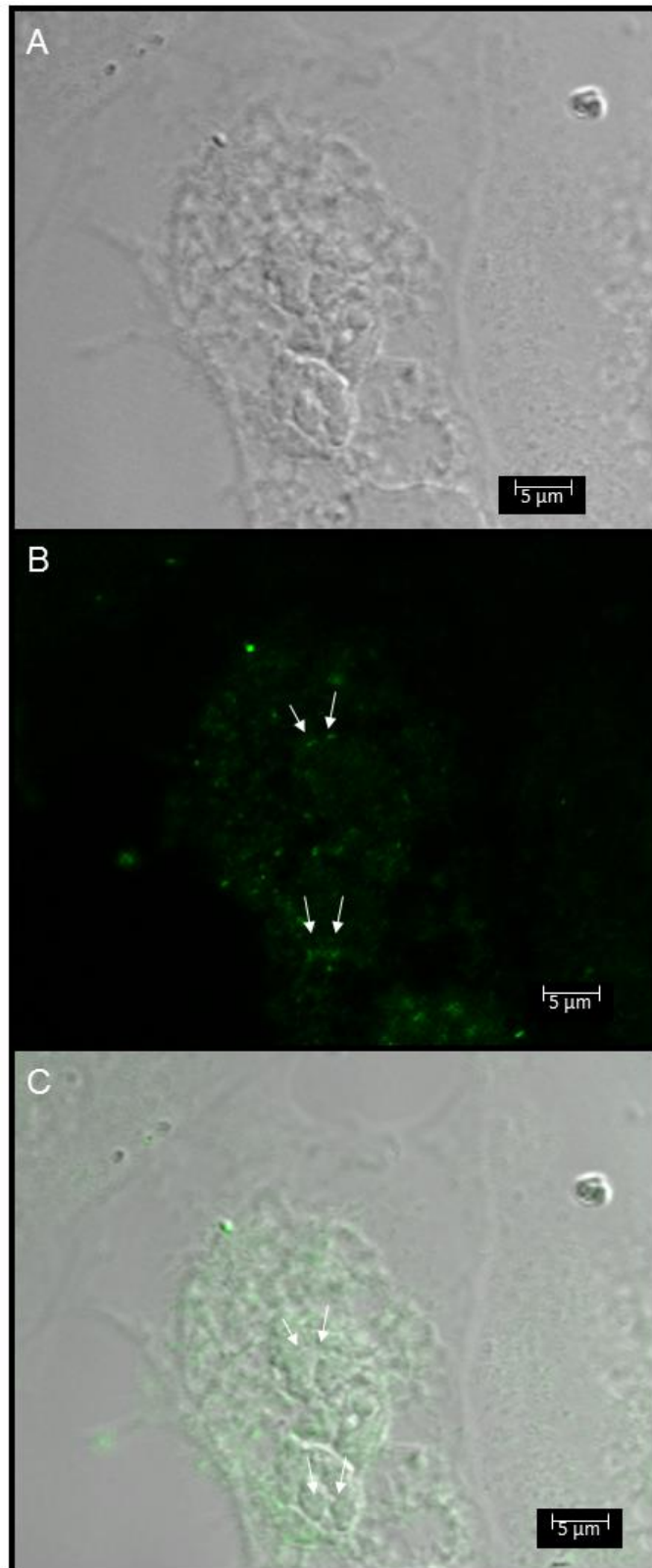


Figura 2. Índice de infecção de células LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii* após 24h, 48h e 6 dias de infecção, tratadas ou não com melatonina. O tratamento com melatonina reduz o índice de infecção. \*Diferente significativamente pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ )

### **5.3. Apoptose (ensaio de TUNEL) de *Toxoplasma gondii* após 48h de tratamento com melatonina**

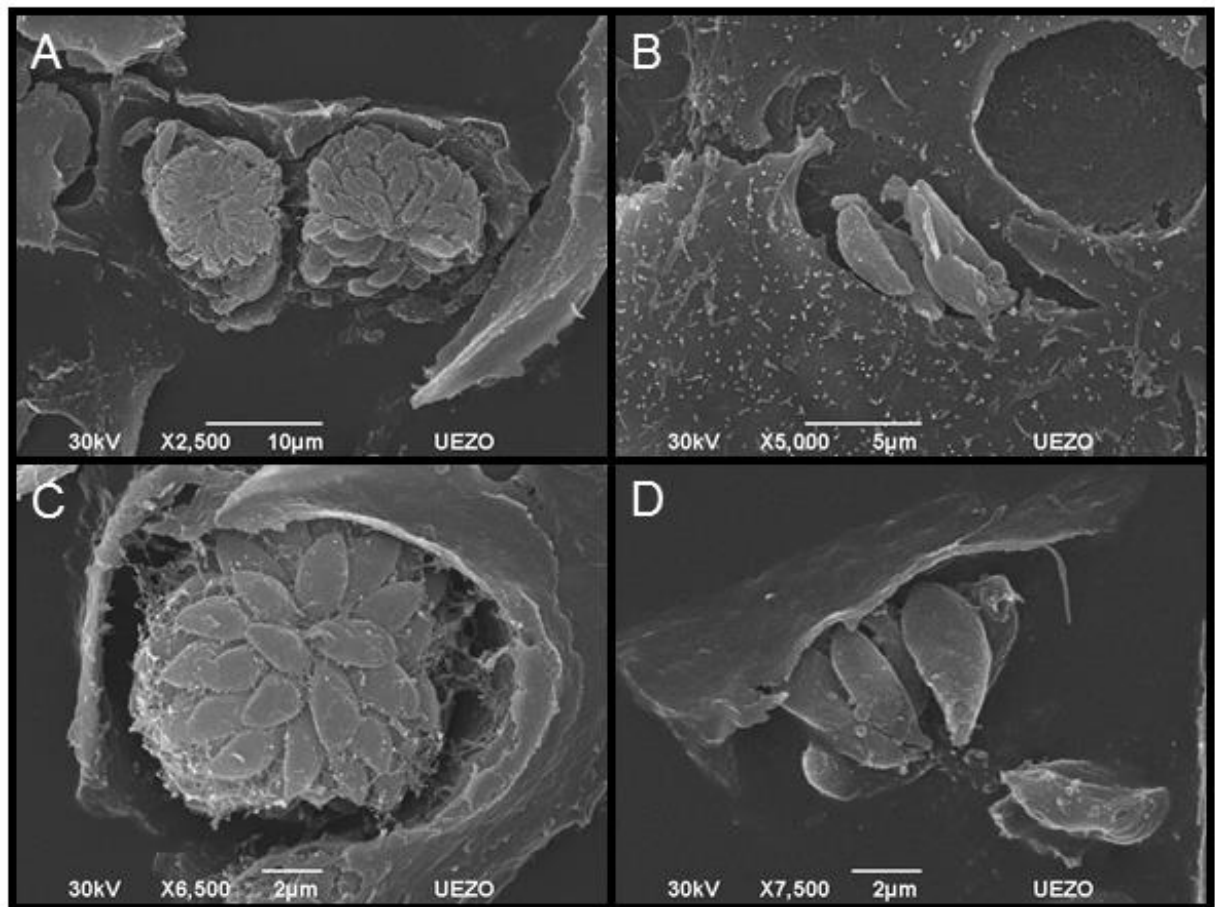
Para avaliar os possíveis mecanismos de morte celular sofridos pelo parasito, células LLC-MK2 infectadas por *T. gondii*, tratadas com melatonina foram processadas para ensaio de TUNEL detectando possivelmente apoptose. Durante a morte celular por apoptose ocorre aumento da atividade de endonucleases fragmentando o DNA (Kyrylkova *et al.*, 2012). A análise demonstrou marcação positiva para DNA fragmentado em parte da população de *T. gondii* indicando que o tratamento com melatonina desencadeia apoptose (Figura 3).



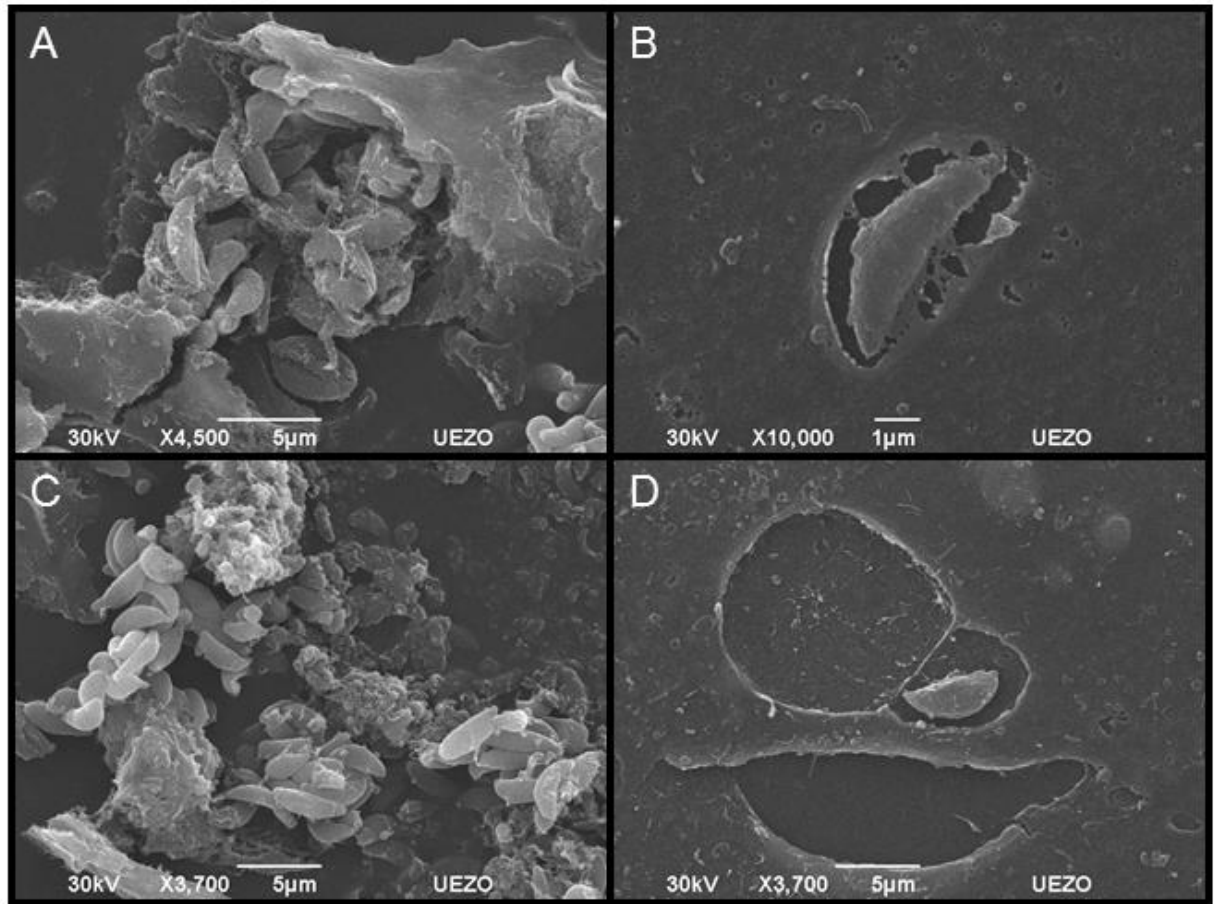
**Figura 3. Imagens por contraste de interferência diferencial e fluorescência após ensaio de TUNEL de células infectadas por *Toxoplasma gondii* tratadas com melatonina. A.** Imagem de contraste de interferência diferencial (DIC) de células hospedeiras infectadas por *T. gondii*. **B.** imagem de fluorescência de parasitos marcados positivamente para fragmentação de DNA (setas). **C.** Sobreposição das imagens de DIC e TUNEL.

#### **5.4. Microscopia eletrônica de varredura de células LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii* após 48h de tratamento com melatonina.**

Análise dos parasitos através de microscopia eletrônica de varredura confirmou grande carga parasitária nas células sem o tratamento com melatonina, sendo possível notar a integridade da morfologia do parasito e formação de rosáceas após 48h de infecção (Figuras 4 A, C). Após o tratamento com melatonina, observou-se redução na carga parasitária nas células LLC-MK2 e incapacidade de formação de rosáceas (Figuras 4 B, D). Seis dias após a infecção das células sem tratamento com melatonina observou-se aumento na carga parasitária, quando comparada a 48h de infecção, ocorrendo o rompimento das células hospedeiras e a preservação da integridade morfológica do parasito (Figuras 5 A, C). Após tratamento com melatonina, observa-se redução na carga parasitária, com a formação de vacúolos contendo somente um parasito (Figuras 5 B, D).



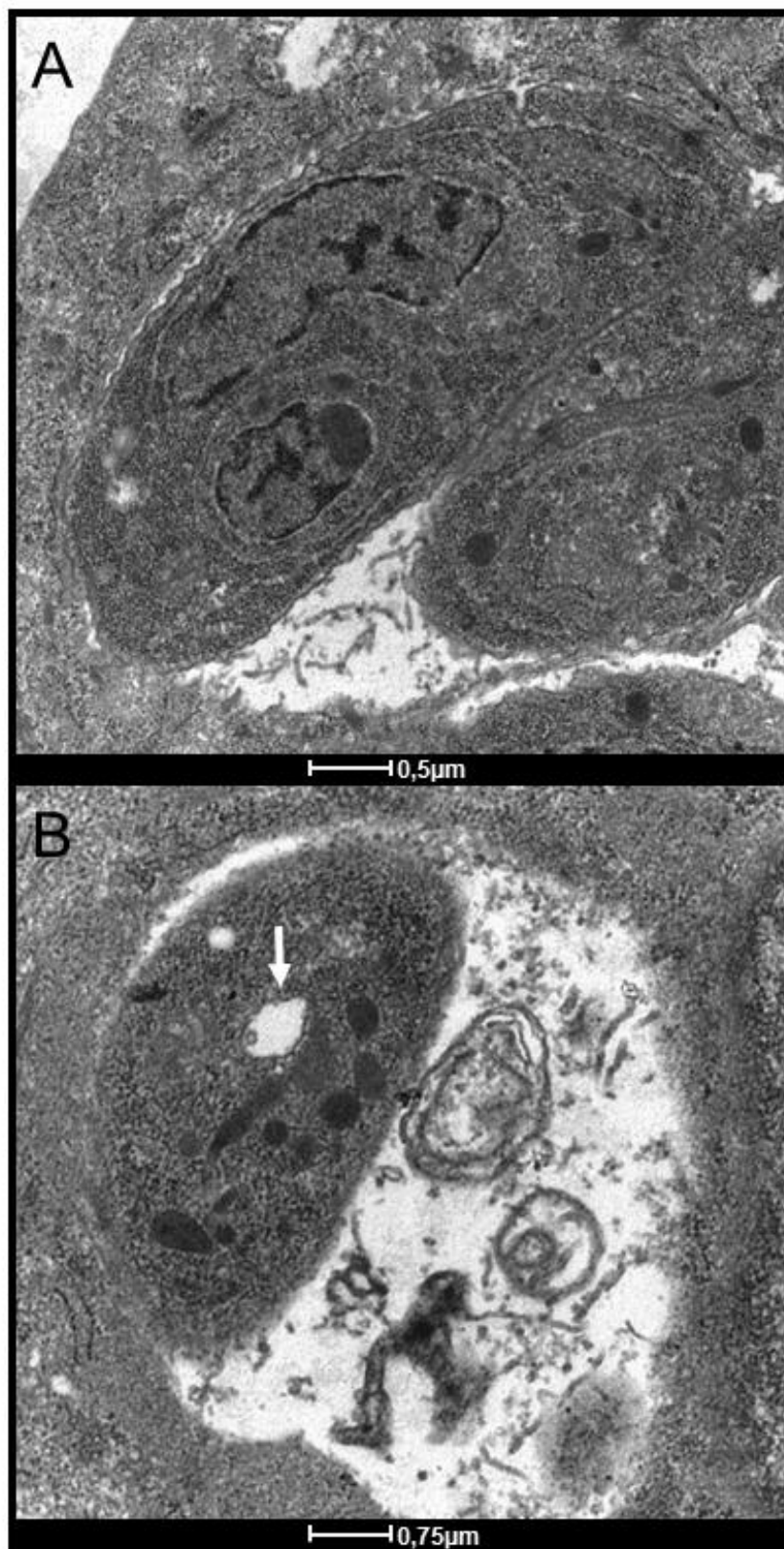
**Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de células hospedeiras LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii*, tratadas ou não com melatonina, após 48h. A e C. Imagens de células hospedeiras após 48h de infecção por *T. gondii*, sem tratamento com melatonina. B e D. Imagens de células hospedeiras infectadas por *T. gondii* após 48h de tratamento com melatonina.**



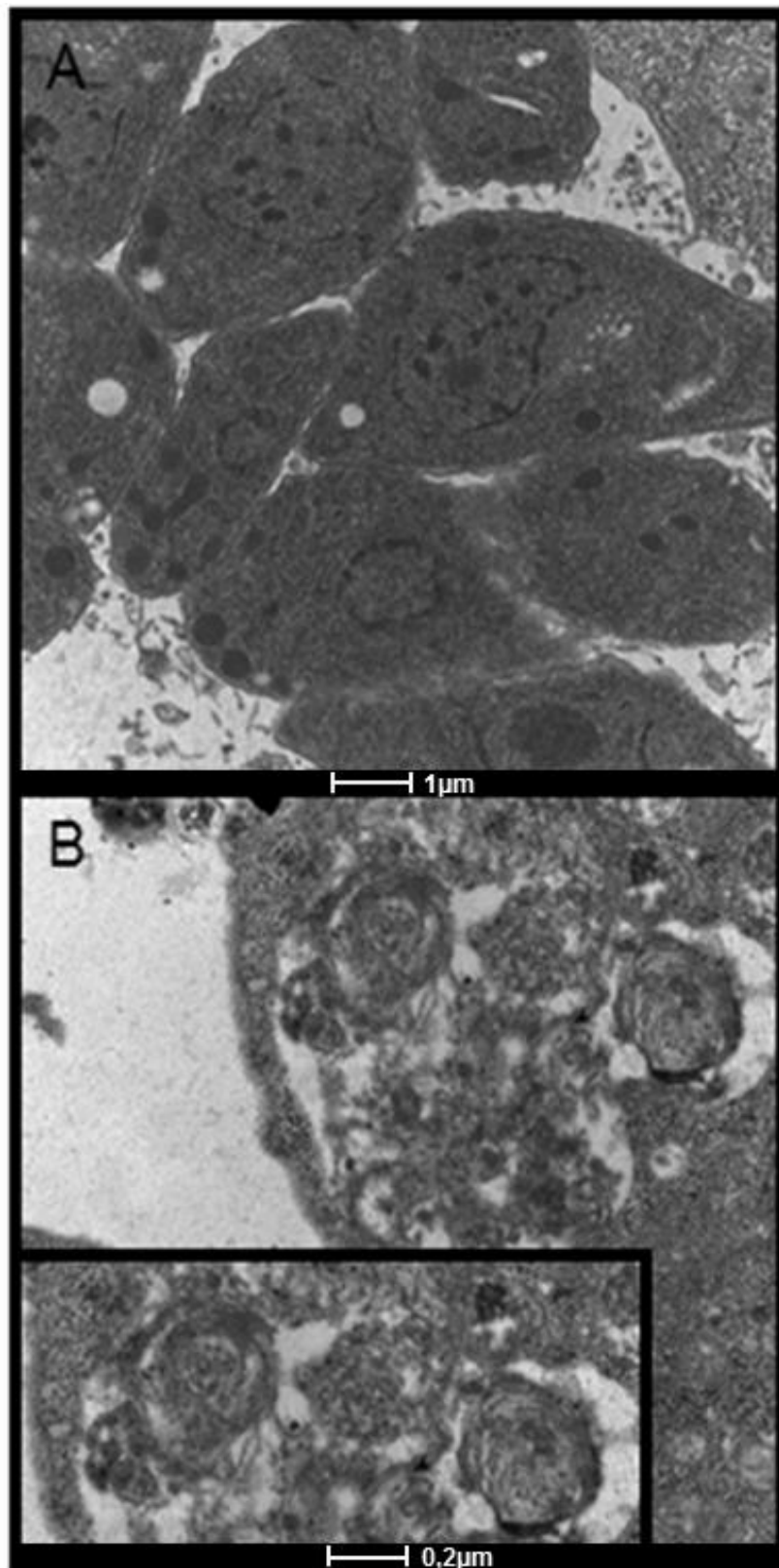
**Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de células hospedeiras LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii*, tratadas ou não com melatonina, após 6 dias. A e C. Imagens de células hospedeiras após 6 dias de infecção por *T. gondii*, na ausência do tratamento com melatonina. B e D. Imagens de células hospedeiras infectadas por *T. gondii* após 6 dias de tratamento com melatonina.**

### **5.5. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas por *Toxoplasma gondii*, após 24h, 48h e 6 dias de tratamento com melatonina.**

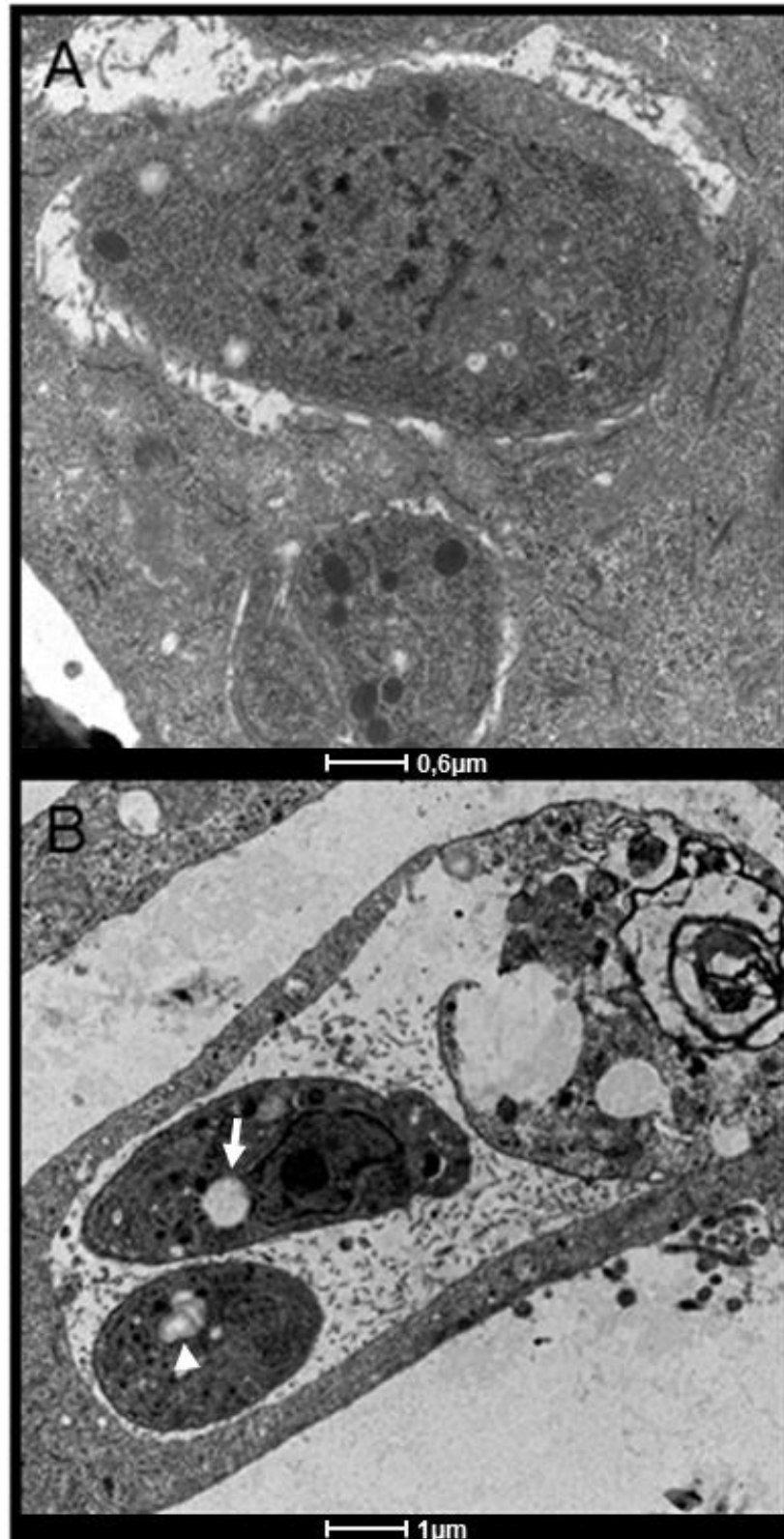
Após 24h de infecção sem tratamento os parasitos mantiveram-se viáveis com sua ultraestrutura preservada (Figura 6 A). Células infectadas com parasitos que foram tratadas com melatonina demonstram a presença de parasito com vacúolo e estruturas de mielina (Figura 6 B) não vistas em vacúolos parasitóforos de células infectadas não tratadas. Após 48h de infecção, células não tratadas com melatonina apresentaram parasitos preservados, observando-se a formação de rosáceas (Figura 7 A). Parasitos em células tratadas com melatonina apresentaram degradação de sua membrana e extravasamento de seu citoplasma (Figura 7 B). Seis dias de infecção sem tratamento com melatonina revelou parasitos preservados (Figura 8 A). Parasitos em células que passaram pelo tratamento com melatonina durante 6 dias apresentaram vacúolo e deformação de sua estrutura e alguns tinham extravasamento do seu citoplasma, decorrente do rompimento de sua membrana (Figura 8 B).



**Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por *Toxoplasma gondii* na ausência e presença do tratamento com melatonina após 24h. A.** Imagem de parasitos intracelulares sem tratamento (controle). **B** Imagem de parasito após tratamento apresentando vacúolo evidente (seta) e a presença de estruturas de mielina.



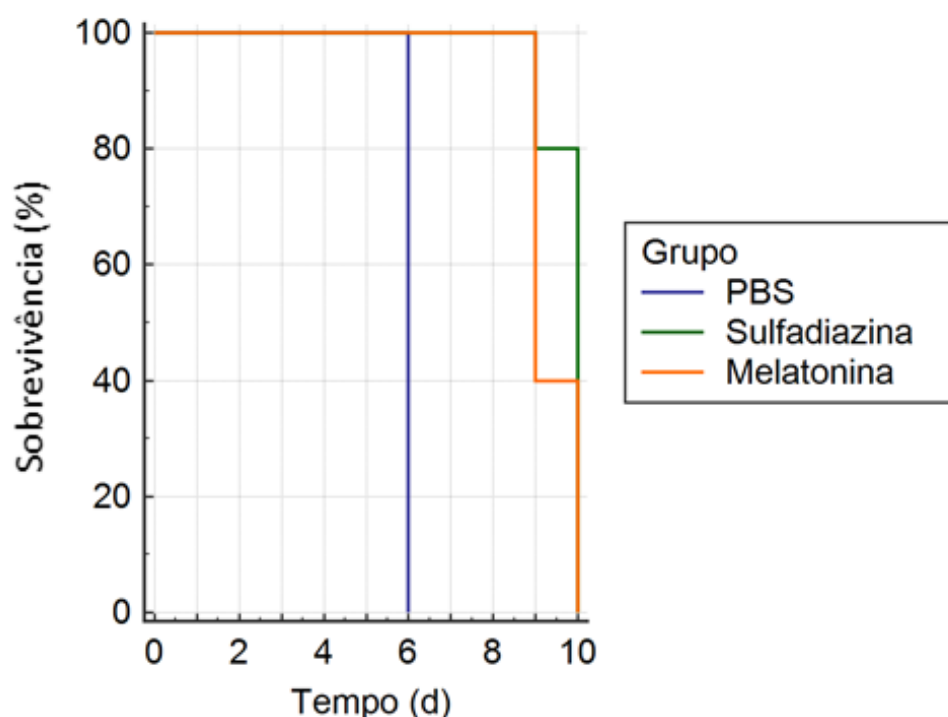
**Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por *Toxoplasma gondii* na ausência e presença do tratamento com melatonina após 48h. A.** Imagem de parasitos intracelulares sem tratamento (controle). **B** Imagem de estruturas intracelulares similares a parasitos degradados após tratamento (imagem ampliada em “inset”).



**Figura 8.** Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por *Toxoplasma gondii* na ausência e presença do tratamento com melatonina após 6 dias. **A.** Imagem de parasitos sem tratamento (controle). **B.** Imagem de parasitos com vacúolos (seta), possíveis grânulos de amilopectina (cabeça de seta) e com membrana plasmática rompida após 6 dias de infecção e tratamento.

### 5.6. Curva de sobrevivência após tratamento com melatonina ou sulfadiazina de camundongos Balb/C infectados por *Toxoplasma gondii*.

Camundongos Balb/C infectados com taquizoítos não tratados morreram no 6º dia de infecção (Figura 7, linha azul). Os animais tratados com melatonina foram sacrificados no 10º dia de infecção para coleta dos órgãos (Figura 7, linha laranja). Os animais tratados com sulfadiazina foram sacrificados no 10º dia após a infecção (Figura 7, linha verde). Os camundongos tratados com melatonina ou sulfadiazina apresentaram semelhança no comportamento durante o tratamento, pois todos estavam mortos no 10º dia de tratamento.



**Figura 9. Sobrevivência de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* durante tratamento com melatonina ou sulfadiazina.** Camundongos Balb/C infectados por *T. gondii* foram tratados ou não com melatonina ou sulfadiazina. Camundongos controle infectados por *T. gondii* que receberam PBS (linha azul) sucumbiram após o 6º dia de infecção. O grupo tratado com sulfadiazina (linha verde), sobreviveu por 10 dias após o tratamento, assim como o grupo tratado com melatonina (linha laranja) após a infecção. No décimo dia de infecção os animais foram sacrificados. Controle significativamente diferente dos tratados ( $P = 0,001$ ).

## 6. Discussão

A toxoplasmose é infecção causada por *T. gondii* e acomete cerca de 30% da população mundial (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2012; Grigg *et al.*, 2015). O tratamento de pacientes infectados utiliza sulfadiazina combinada à pirimetamina, porém, ocorrem graves efeitos colaterais ao longo do tratamento (Campos *et al.*, 2014). Nestes casos, a administração de sulfadiazina e pirimetamina é repostada pelo tratamento baseado no sinergismo entre espiramicina e clindamicina (Nye, 1979). Para todos os casos o metabolismo de ácido folínico no organismo hospedeiro é afetado, sendo necessária a administração concomitante de ácido folínico. Portanto, existe grande necessidade de novos tratamentos contra a toxoplasmose.

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal que possui funções fisiológicas de extrema importância, como a regulação do sono e da pressão arterial. No entanto, foi descrita recentemente a eficácia do tratamento com melatonina em casos de infecção por *Leishmania* spp. (Elmahallawy *et al.*, 2014), *Plasmodium* spp. (Srinivasan *et al.*, 2010; Bagnaresi *et al.*, 2012), e *Trypanosoma cruzi* (Santello *et al.*, 2007; Cardinali & Alvarez, 2011; Bagnaresi *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013). Nesse trabalho foi testado se a melatonina tem potencial anti-*T. gondii*.

Para avaliar a possível atividade da melatonina realizou-se a infecção de células LLC-MK2 com *T. gondii* e tratamento com esse composto. Inicialmente, observou-se redução do crescimento do parasito em células tratadas com melatonina. O resultado mais expressivo foi obtido após 6 dias de tratamento, com expressiva redução do índice de infecção. Células que não passaram pelo tratamento demonstraram, além de elevados níveis de parasitos, grande quantidade de células rompidas após 6 dias de infecção. Células tratadas demonstraram preservação de sua morfologia e presença de vacúolos contendo pequena quantidade de parasitos, alguns com somente um parasito. Em grande parte das células não foi observada a presença de parasitos. Portanto, o tratamento com melatonina controlou a proliferação do parasito, indicando que a melatonina tem potencial para atuar como terapia anti-toxoplasma.

Para analisar o possível mecanismo de morte do parasito, realizou-se ensaio para apoptose. A análise da infecção após o tratamento indicou ativação de mecanismos de morte celular por apoptose em parte da população de parasitos.

Esses dados corroboram os já descritos para *Plasmodium* spp. no qual foi demonstrado morte celular por apoptose após tratamento com melatonina (Bagnaresi *et al*, 2012). Isso sugere que a melatonina possa estar agindo de forma semelhante em parasitos do filo Apicomplexa.

Análises ultraestruturais foram realizadas para avaliar possíveis modificações do parasito após o tratamento com melatonina. Foi observada redução no número de parasitos em células que foram tratadas e a presença de vacúolos parasitóforos com número reduzido de parasitos. Após 48h de tratamento, células controle apresentaram rosáceas, enquanto que em células tratadas com melatonina essas estruturas não foram observadas. Esses resultados confirmam os dados obtidos por microscopia óptica, sugerindo que a melatonina tem potencial para tratamento anti-*T. gondii*. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão permitiram a visualização de parasitos com membrana rompida, ocorrendo, por consequência, o extravasamento do seu citoplasma, assim como a presença de alguns parasitos viáveis ou em início de processo de rompimento de membrana. Estas características são típicas de morte celular por necrose secundária, decorrente do processo de apoptose. Como já descrito para *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto *et al.*, 2009), parasitos podem sofrer morte celular por diferentes mecanismos simultaneamente, como apoptose, necrose e autofagia, o que justifica a ativação de diferentes tipos de morte por *T. gondii* após o tratamento com melatonina.

Experimentos *in vivo* foram realizados para avaliar a eficácia do tratamento de camundongos infectados por taquizoítos de *T. gondii*. Os animais dos grupos tratados tanto com sulfadiazina ou melatonina foram sacrificados no 10º dia de infecção, sobrevivendo mais do que animais não-tratados. Como no caso da infecção por *T. gondii*, camundongos infectados por *T. cruzi* e tratados com melatonina mostraram redução na carga parasitária durante as fases aguda e crônica da doença (Santello *et al.*, 2007) e diminuição de atividade inflamatória no coração (Oliveira *et al.*, 2013). Em ambos os tratamentos os camundongos apresentaram comportamento normal, sem nenhuma alteração fisiológica. Estes resultados indicam que a melatonina é capaz de aumentar a sobrevivência de hospedeiros infectados por *T. gondii*, com a administração de concentrações menores de melatonina quando comparado ao tratamento atualmente utilizado.

A fim de melhor entender o papel microbicida da melatonina durante a infecção por *T. gondii* quando comparado a outras drogas, os próximos passos para este trabalho são: (a) utilizar tratamento sinérgico com melatonina e os fármacos já utilizados no tratamento, como a sulfadiazina e a pirimetamina; (b) utilizar tratamento sinérgico com melatonina e metalocomplexos, sendo estes formados pela sulfadiazina com núcleos metálicos, produzidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

## **7. Conclusão**

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com melatonina reduz a carga parasitária de *T. gondii* em células hospedeiras. Esta redução ocorre pela morte do parasito por apoptose em parte da população e também por necrose, com preservação da célula hospedeira durante todo o tratamento. O tratamento com melatonina, portanto, pode ser de grande eficácia no combate à infecção por *T. gondii*.

## 8. Referências Bibliográficas

- Al-Lohedan, H.A.; Sajih, A.M. Sulfadiazine binds and unfolds bovine serum albumine: an *in vitro* study. **Molecular Biology Reports** (2013), 40: 6081-6090.
- Álvarez, J. M.; Fonseca, R.; Da Silva, H.B.; Marinho, C.R.F.; Bortoluci, K.R.; Sardinha, L.R.; Epiphanyo, S.; Lima, M.R.D. Chagas disease: Still Many Unsolved Issues. **Mediators of Inflammation**. (2014, ID 912965, 9 páginas, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/912965>).
- Araujo, F.G.; Remington, J.S. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. (1974), 5: 647-651.
- Aspinalli, T.V.; Joynton, D.H.M.; Guy, E.; Hyde, J.E.; Sims, P.F.G. The Molecular Basis of Sulfonamide Resistance in *Toxoplasma gondii* and Implications for the Clinical Management of Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases** (2002), 185: 1637-1643.
- Atmaca, L.S.; Simsek, T.; Batioglu, F. Clinical Features and Prognosis in Ocular Toxoplasmosis. **Japanese Ophthalmological Society** (2004), 48: 386-391.
- Axelrold, J.; Weissbach, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to serotonin. **Science** (1960), 131: 1312-1312.
- Bagnaresi, P.; Alves, E.; Da Silva, H. B.; Epiphanyo, S.; Mota, M. M.; Garcia, C. R. S. 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.; Nakabashi, M., Thomas, A. P.; Reiter, R. J.; Garcia, C. R. S. The role of melatonin in parasite biology. **Molecular and Biochemical Parasitology** (2012), 181: 1-6.
- Bahia-Oliveira, L.M.; Jones, J.L.; Azevedo-Silva, J.; Alves, C.C.; Orefice, F.; Adiss, D.G. Highly endemic, water Born e toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal** (2003), 9: 55-62.
- Baltaci, A.K.; Bediz, C.S.; Mogulkoc, R.; Kurtoglu, E.; Pekel, A. Effect of Zinc and Melatonin Supplementation on Cellular Immunity in Rats with Toxoplasmosis. **Biological Trace Element Research** (2003), 96: 237-245.

- Baltaci, A.K.; Rasim, M.; Turkoz, Y.; Bediz, C.S.; Ozugurlu, F. The effect of pinealectomy and zinc deficiency on nitric oxide levels in rats with induced *Toxoplasma gondii* infection. **Swiss Medical Weekly** (2004), 134: 359-363.
- Baltaci, A.K.; Mogulkoc, R.; Bediz, C.S.; Pekel, A. Effects of Zinc Deficiency and Pinealectomy on Cellular Immunity in Rats Infected with *Toxoplasma gondii*. **Biological Trace Element Research** (2005), 104: 48-56.
- 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.
- Berhouma, M. Beyond the pineal gland assumption: A neuroanatomical appraisal of dualism in Descartes' philosophy. **Clinical Neurology and Neurosurgery** (2013), 115: 1661-1670.
- Blader, I.J.; Saeij, J.P. Communication 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.
- Bonhomme, A.; Pingret, L.; Pinon, J.M. Review: *Toxoplasma gondii* cellular invasion. **Parassitologia** (1992), 34: 31-43.
- Bubenik, G. A. Gastrointestinal melatonin. Localization, function, and clinical relevance. **Digestive Disease and Sciences** (2002), 47: 2336-2348.
- Campos, F.A.; De Andrade, G.M.Q.; Lanna, A.P.S.; Lage, B.F.; Assumpção, M.V.M.; Pinto, J.A. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** (2014), 8: 609-617.
- 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.
- Carlson, L.L.; Weaver, D.R.; Reppert, S.M. Melatonin Signal Transduction in Hamster Brain: Inhibition of Adenylyl Cyclase by a Pertussis Toxin- Sensitive G Protein. **Endocrinology** (1989), 125: 2670-2676.

- Carrilo-Vico, A.; Calvo, J. R.; Abreu, P.; Lardone, P. J.; García-Mauriño, S.; Reiter, R. J.; Guerrero, J. M. 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.
- Chew, W.K.; Segarra, I.; Ambu, S.; Mak, J.W. Significant Reduction of Brain Cysts Caused by *Toxoplasma gondii* after Treatment with Spiramycin Coadministered with Metronidazole in a Mouse Model of Chronic Toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (2012), 56: 1762-1768.
- Childs, L. M.; Buckee, C. O. Dissecting the determinants of malaria chronicity: why within-host models struggle to reproduce infections dynamics. **Journal of the Royal Society Interface** (2015), 12: 20141379.
- Chodos, J.B.; Habegger-Chodos, H. The treatment of ocular toxoplasmosis with Spiramycin. **Archives of Ophtalmology** (1961), 65: 109-117.
- Claustrat, B.; Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. **Neurochirurgie** (2005), 703: 8 páginas.
- Clem A. A current perspective on leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases** (2010), 2: 124-126.
- 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.
- Da Silva, M.G.; Vinaud, M.C.; De Castro, A.M. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **Plos One** (2015), 10(11): e0141700. doi:10.1371/ journal.pone.0141700.
- Dawood, Z.; Shah, N.; De Sousa, A. Melatonin agonists: a brief clinical review. **Delhi Psychiatry Journal** (2012), 15: 268-273.

- Del Gobbo, V.; Libri, V.; Villani, N.; Calio, R.; Nistico, G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. **International Journal of Immunopharmacology** (1989), 11: 567-573.
- Di Bella, G.; Mascia, F.; Gualano, L.; Di Bella, L. Melatonin Anticancer Effects: Review. **International Journal of Molecular Sciences** (2013), 14(2): 2410-2430.
- Dubey, J. P.; Frenkel, J. K. Experimental Toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. **The Journal of Parasitology** (1973), 59: 505-512.
- Dubey, J.P. Long term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research** (1988), 49: 910-913).
- Dubey, J.P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: KREIER, J.P. 6.ed. Parasitic protozoa. San Diego: Academic (1993), p. 385.
- 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.; Lago, E.G.; Gennari, S.M.; Su, C.; Jones, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology** (2012), 139: 1375-1424.
- Dunn, D.; Wallon, M.; Peyron, F.; Petersen, E.; Peckham, C.; Gilbert, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *The Lancet* (1999), 353: 1829-1833.
- Edinger, A.L.; Thompson, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology** (2004), 16: 663-669.
- Elmahallawy, E. K.; Jiménez-Aranda, A.; Martínez, A. S.; Rodriguez-Granger, J.; Navarro-alarcón, M.; Gutiérrez-Fernández, J.; Agil, A. Activity of melatonin against *Leishmania infantum* promastigotes by mitochondrial dependent pathway. **Chemico-Biological Interactions** (2014), 220: 84-93.
- Eyles, D.E. Coleman, N. An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. **Antibiotics & Chemotherapy** (1955), 5: 529-539.

Falco, E.A.; Goodwin, L.G.; Hitchings, G.H.; Rollo, I.M.; Russell, P.B. 2:4 Diaminopyrimidines - A new series of antimalarials. **British Journal of Pharmacology** (1951), 6: 185-200.

**Farmanguinhos.** Retirado de:  
<http://www.far.fiocruz.br/farmanguinhos/images/stories/phocadownload/sulfadiazina.pdf>. Acessado em 16/11/2015

Fayer, R.; Melton, M.L.; Sheffield, H.G.; Quinine inhibition of host cell penetration by *Toxoplasma gondii*, *Besnoitia jellisoni*, and *Sarcocystis* sp. *in vitro*. **Journal of Parasitology** (1972), 58: 595-599.

Ferguson, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, **Homanage to Nicolle, Manceaux and Splendore**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (2009), 104: 133-148.

Frenkel, J.K. Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. **In The Coccidia**. University Park Press. (1973), 343-410.

Frenkel, J.K. Toxoplasmosis in human beings. **Journal of the American Veterinary Medical Association** (1990), 196: 240-248.

Garin, J.P., Eyles, D.E. Le traitement de la toxoplasmose experimentale de la souris par La spiramycine. **La Presse Médicale**. (1958), 66: 957–958.

Gazarini, M. L.; Garcia, C. R. S. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca<sup>2+</sup> fluctuations. **Biochemical and Biophysical Research Communications** (2014), 321: 138-144.

Gras, L.; Wallon, M.; Pollak, A.; Cortina-Borja, M.; Evengard, B.; Hayde, M.; Petersen, E.; Gilbert, R. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: A cohort study in 13 European centres. **Acta Paediatrica** (2005), 94: 1721-1731.

Grigg, M.E.; Dubey, J.P. Nussenblatt, R.B. Ocular toxoplasmosis: A lesson from Brazil. **American Journal of Ophthalmology** (2015), 159: 999-1001.

Gürter, R.E.; Yadon, Z.E. Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** (2015), 109: 91-98, doi: 10.1093/trstmh/tru203.

Halonen, S.K.; Weiss, L.M. Toxoplasmosis. **Handbook of clinical neurology** (2013), 114: 125-145.

- Harding, C.R. Meissner, M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*. **Cellular Microbiology** (2014), 16: 6320-641.
- Haverkos, H. W. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE Study Group. **The American Journal of Medicine**. (1987), 82: 907–914.
- Heintzelman, M.B. Gliding motility in apicomplexan parasites. **Seminars in Cell & Developmental Biology** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.020>.
- Henriquez, M.; Armisen, R.; Stutzin, A.; Quest, A.F.G. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Current Molecular Medicine** (2008), 8: 187-206.
- 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.
- Holland, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology** (2003), 136- 973-988.
- Jacobs, L.; Remington, J.S.; Melton, M.L. The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*. **The American Society of Parasitology** (1960), 46: 11-21.
- Jacobson, M.D.; Weil, M.; Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell** (1997), 88: 347-354.
- Janich, P.; Meng, Q.J.; Benitah, S.A. Circadian control of tissue homeostasis and adult stem cells. **Current Opinion in Cell Biology** (2014), 31: 8-15.
- Kalsbeek, A.; Garidou, M.L.; Palm, I.F.; Van Der Vliet, J.; Simonneaux, V.; Pévet, P.; Buijs, R.M. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. **European Journal of Neurosciences** (2000), 12: 3146-3154.
- Katlama, C., De Wit, S., O'doherty, E., Van Glabeke, M., Clumeck, N. Pyrimethamine 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.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer** (1972), 26: 239-257.

- Khadem, F.; Uzonna, J. E.; Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology** (2014), 9: 901-915.
- Kijlstra, A.; Petersen, E. Epidemiology, Pathophysiology, and the future of ocular toxoplasmosis. **Ocular Immunology & Inflammation** (2013), 22: 138-147, DOI: 10.3109/09273948.2013.823214.
- Kyrylkova, K.; Kyryachenko, S.; Leid, M.; Kioussi, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. **Methods in molecular biology** (2012), 887: 41-47, 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.
- Li X-L, Wei H-X, Zhang H, Peng H-J, Lindsay DS. A Meta Analysis on Risks of Adverse Pregnancy Outcomes in *Toxoplasma gondii* Infection. **PLoS ONE** (2014) 9: e97775. doi:10.1371/journal.pone.0097775.
- Liu, Q.; Wang, Z.D.; Huang, S.Y.; Zhu, X.Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vectors** (2015), 8:292.
- Loo, D.T. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. **Methods in Molecular Biology** (2011), 682: 3-13.
- Lyons, R.E.; Johnson, A.M. Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology** (1995), 17: 353-359.
- Lyons, R.E.; McLeod, R.; Roberts, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology** (2002), 18: 198-201.
- Machado, A.S.; Carneiro, A.C.A.V.; Béla, S.R.; Andrade, G.M.Q.; Vasconcelos-Santos, D.V.; Januário, J.N.; Coelho-dos-Reis, J.G.; Ferro, E.A.V.; Teixeira-Carvalho, A.; Vitor, R.W.A.; Martins-Filho, O.A. Biomarker Analysis Revealed Distinct Profiles of Innate and Adaptive Immunity in Infants with Ocular Lesions of Congenital Toxoplasmosis. **Mediators of Inflammation** (2014), 2014: 1-13.
- Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E. H.; Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Cell death and autophagy** (2014), 15: 81-94.

- McMahon, D.G.; Iuvone, P.M.; Tosini, G. Circadian Organization of the Mammalian Retina: From Gene Regulation to Physiology and Diseases. **Progress in retinal and eye research** (2014), 39: 58-76.
- McMaster, P.R.B., Powers, K.G., Finerty, J.F., Lunde, M.N. The effect of two chlorinated Lincomycin analogues against acute toxoplasmosis in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** (1973), 22: 14–17.
- Menna-Barreto, R.F.; Salomão, K.; Dantas, A.P.; Santa-Rita, R.M.; Soares, M.J.; Barbosa, H.S.; de Castro, S.L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron** (2009), 40: 157-168.
- Ministério da saúde. Retirado de: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_bolso\\_5ed2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_5ed2.pdf). Acessado em 16/01/2016).
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. **The Lancet** (2004), 363: 1965-1976.
- Morar, M.; Bhullar, K.; Hughes, D.W.; J, M.; Wright, G.D. Structure and Mechanism of the Lincosamide Antibiotic Adenylyltransferase LinB. **Structure** (2009), 17: 1649-1659.
- 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 voisons) 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., Hu, K., Murray, J. M., Roos, D.S. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science** (2008), 121: 1559-1568.
- Nye, F. J. Treating toxoplasmosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (1979), 5: 244-246.
- O'Connor, G.R. Manifestations and management of ocular toxoplasmosis. **Bulletin of the New York academy of medicine** (1974), 50: 192-210.
- Oliveira, L. G. R.; Kuehn, C. C.; Dos Santos, C.D.; Miranda, M. A.; Da Costa, C. M. B.; Mendonça, V. J.; Junior, J. C. P. Protective actions of melatonin against heart damage during chronic Chagas disease. **Acta Tropica** (2013), 128: 652-658.

- Oz, H.S. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. **Frontiers in microbiology** (2014), 5: 385.
- Park, Y.H.; Nam, H.W. Clinical Features and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. **The Korean Journal of Parasitology** (2013), 51: 393-399.
- Perold, Z.; Caira, M.R.; Brits, M. The Risk of Recrystallization: Changes to the Toxicity and Morphology of Pyrimethamine. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences** (2014), 17: 190-206.
- Pinnert-Sindico, S.; Pellerat, J. A new antibiotic: a spiramycin study of its *in vitro* activity. **Therapie** (1956), 11: 308-323.
- Poon, A.M.S.; Liu, Z.M.; Pang, C.S.; Brown, G.M.; Pang, S.F. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. **Biological signals and receptors** (1994), 3: 107-111.
- Raikhlin, N. T.; Kvetnoy, I. M. Melatonin and enterochromaffine cells. **Acta Histochemica** (1976), 55: 19-24.
- Rajendran, C.; Su, C.; Dubey, J.P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, Genetics and Evolution** (2012), 12: 359-368.
- Reddy, A.B.; O'Neill, J.S. Healthy clocks, healthy body, health mind. *Trends in Cell Biology* (2009), 20: 36-44.
- Reiter, R. J. The mammalian pineal gland: Structure and function. **American Journal of Anatomy** (1981) 162: 287-313.
- Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Korkmaz, A.; Rosales-Corral, S. A. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, maternal, placental and fetal physiology. **Human Reproduction Update** (2004), 20: 293-307.
- Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. and Klein, J. (eds) **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 5<sup>a</sup> edição. Philadelphia, PA: W. B. Saunders, p. 205–346, 2001.
- Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; Ebisawa, T. Cloning and Characterization of a Mammalian Melatonin Receptor That Mediates Reproductive and Circadian Responses. **Neuron** (1994), 13: 1177-1185.
- Reppert, S.M. Weaver, D.R. Coordination of circadian time in mammals. **Nature** (2002), 418: 935-941.

- Robert-Gangneaux, F.; Dardé, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews** (2012), 25:264-292.
- Robinson, I.; Reddy, A.B. Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. **FEBS Letters** (2014), 588: 2477-2483.
- Rolston, K.V.I. Treatment of acute toxoplasmosis with oral Clindamycin. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases** (1991), 10: 181-183.
- 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.; Frare, E. O.; Dos Santos, C. D.; Toldo, M. P. A.; Kawasse, L. M.; Zucoloto, S.; Do Prado, Jr, J. C. Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Pineal Research** (2007), 42: 359-363.
- Shalini, S.; Dorstyn, S.; Dawar, S.; Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation** (2014), 22: 526-539.
- Sheffield, H.G.; Melton, M.L. The Fine Structure and Reproduction of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology** (1968), 54: 209-226.
- Sibley, D.L.; Khan, A.; Ajioka, J. W.; Rosenthal, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of The Royal Society** (2009), 364: 2749-2761.
- Silveira, C.; Jr, B.R.; Jr, M.B.; Nussenblatt, R. Acquired Toxoplasmic Infection as the Cause of Toxoplasmic Retinochoroiditis in Families. **American Journal of Ophtalmology** (1988), 106: 362-364.
- 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: 253-260.

- Slominski, A.; Fischer, T. W.; Zmijewski, M. A.; Worstman, J.; Semak, I.; Zbytek, B.; Slominski, R. M.; Tobin, D. J. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. **Endocrine** (2005), 27: 137-147.
- Splendore A. Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel., **Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo** 1908; 3: 109–112.
- Srinivasan, S.; Spence, D. W.; Moscovitch, A.; Pandi-perumal, S. R.; Trakht, I.; Brown, G. M.; Cardinali, D. P. Malaria: therapeutic implications of melatonin. **Journal of pineal research** (2010), 48: 1-8.
- Subauste, C.S.; Ajzenberg, D.; Kijlstra, A. Review of the Series “Disease of the Year 2011: Toxoplasmosis” Pathophysiology of Toxoplasmosis. **Ocular Immunology & Inflammation** (2011), 19: 297-306.
- Tabbara, K.F.; Nozik, R.A.; O'Connor, R. Clindamycin Effects on Experimental Ocular Toxoplasmosis in the Rabbit. **Archives of Ophtalmology** (1974), 92: 244-247.
- Tabbara, K.F.; O'Connor, G.R. Treatment of ocular toxoplasmosis with clindamycin and sulfadiazine. **Ophtalmology** (1980), 87: 129-134.
- Takahashi, J.S.; Hong, H.K.; Ho, C.H.; McDearmon, E.L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics** (2008), 9: 764-775.
- Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology** (2000), 30: 1217-1258.
- Thiersch, J.B. Effect of certain 2,4-diaminopyrimidine antagonists of folic acid on pregnancy and rat fetus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** (1954), 87: 571-577.
- Tosini, G.; Menaker, M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. **Brain Research** (1998), 789: 221-228.
- Van der Meer, F.J.; Faber, D.J.; Aalders, M.C.G.; Poot, A.A.; Vermes, I.; Van Leeuwen, T.G. Apoptosis-and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science** (2010), 25: 259-267.

- Vanecek, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews** (1998), 78: 687-711.
- Vasconcelos-Santos, D.V.; Azevedo, D.O.M.; Campos, W.R.; Oréface, F.; Queiroz-Andrade, G.M.; Carellos, E.V.M.; Romanelli, R.M.C.; Januário, J.N.; Resende, J.M.; Martins-Filho, O.A.; Carneiro, A.C.A.V.; Vitor, R.W.A.; Caiaffa, W.T. Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil: Results of Early Ophthalmologic Examination of a Large Cohort of Neonates. **American Academy of Ophthalmology** (2009), 116: 2199-2205.
- Vermeulen, K.; Bockstaele, D.R.V.; Berneman, Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology** (2005), 84: 627-639.
- Vielma, J. R.; Bonilla, E.; Chácín-Bonilla, L.; Mora, M.; Medina-Leendertz, L.; Bravo, Y. Effects of melatonina on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: A review. **Acta Tropica** (2014), 31-38.
- Weiss, L.M.; Kim, K. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. Perspectives and Methods. **Academic Press** (2007), 1: 800.
- 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.
- Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.R; Currie, A.R. Cell death: The significance of apoptosis. **International Review of Cytology** (1980), 68: 251-300.
- Zamboni, D.S.; Lima-Junior, D.S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews** (2015), 265: 156-171.
- Zhang, H.; Zhang, Yiqiang. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research** (2014), 57: 131-146.