

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**ATIVIDADE FUNCIONAL DE FAGÓCITOS DO COLOSTRO, DE MÃES
CLIMATÉRICAS, MODULADOS POR MELATONINA E CORTISOL NA
PRESENÇA DE *Giardia lamblia*.**

Queli Lisiane Castro Pereira

**Belo Horizonte – MG
2015**

QUELI LISIANE CASTRO PEREIRA

**ATIVIDADE FUNCIONAL DE FAGÓCITOS DO COLOSTRO, DE
MÃES CLIMATÉRICAS, MODULADOS POR MELATONINA E
CORTISOL NA PRESENÇA DE *Giardia lamblia*.**

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Dra. Adenilda Cristina Honório França

**Belo Horizonte
2015**

Colaboradores

Laboratório de Imunomodulação e Saúde Materno-Infantil, ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças-MT.

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

Profa. Dr. Eduardo Luzia França

Profa. Dra. Danny Laura Gomes Fagundes

Doutoranda Cristiane de Castro Penet Hara

Doutoranda Rubian Trindade da Silva Fernandes

Laboratório de Amebíase, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte-MG.

Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes

João Costa Vyana

Instituições Parceiras

Universidade Federal de Mato Grosso- UFMT

Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG

Suporte Financeiro

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMAT- Fundação para o Amparo à Pesquisa de Estado de Mato Grosso

Aleitamento Materno

Alzira Carlos - Educadora de Saúde

Toda criança ao nascer
Tem que ser amamentada
Pra ela poder crescer
Feliz, forte e imunizada
Melhor que tomar remédio
É ter peito e dar mamada

Toda mãe que amamenta
Adquire mais saúde
O filho ela alimenta
Pra Deus é uma virtude
Dar continuidade a vida
Com paz e magnitude

É um ato de carinho
De amor e de grandeza
Mãe que amamenta o filhinho
Seu leite é fortaleza
Mata a fome, é anticorpos
Leite materno é riqueza

É alimento completo
Até os seis meses de vida
Com muito amor e afeto
Toda mãe é assistida
No ambiente de trabalho
Ela é bem sucedida

São inúmeras as doenças
Que o aleitamento evita
É preciso consciência
Pois o bebê necessita
De amor, paz e carinho
No ambiente que habita

Não precisa mamadeira
Chupetas, mingau, nem suquinho
Até o chá de cidreira
Não ofereça ao seu filhinho
Até os seis meses de vida
Dê só peito e carinho

Vamos todos incentivar
As mães do nosso país
Pras crianças amamentar
Mãe e filho é mais feliz
Filho forte, mãe suadável
A medicina é quem diz.

AGRADECIMENTOS

O conteúdo desta tese revela e reflete a contribuição de uma ampla rede de relações na qual, felizmente, estou envolvida e à qual agradeço sinceramente.

Além de agradecer, que me parece pouco neste momento, quero oferecer o resultado e dar crédito à dedicação de tanta gente, esperando que este estudo possa gerar novas reflexões e ações.

Muito Obrigada

A **Deus**, pelas oportunidades que tenho tido ao longo da vida e por me permitir mais esta conquista.

]Aos meus pais **João Pedro Trindade Pereira** e **Enir Castro Pereira** pelo constante apoio incondicional, incansável incentivo e por me contemplarem com o maior legado que os pais podem deixar a um filho, a vida, o caráter e a educação.

Aos professores idealizadores deste DINTER **Adenilda Cristina Honório França**, **Eduardo Luzia França** e **Érika Martins Braga**.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia UFMG/UFMT pelos ensinamentos empreendidos e pela oportunidade acadêmica.

À minha orientadora **Adenilda Cristina Honório França** por contribuir com seu conhecimento, humanismo e dinamismo no meu aperfeiçoamento profissional, pela dedicação irrestrita, pela sólida competência profissional e em especial por sua solidariedade e generosidade acadêmica.

Aos membros do Grupo de Estudos e Pesquisa Saúde Materno Infantil pelo convívio harmonioso, pelas trocas, pelo aprendizado e pelo grande estímulo, em especial à **Cristiane de Castro Penet Hara**, **Rubian Trindade da Silva Fernandes**, **Danny Laura Gomes Fagundes** e **Lucélia Campelo**. Tenham a certeza que vocês fizeram toda a diferença e tornaram esse transcurso mais leve e feliz com a energia positiva de vocês.

Ao técnico **João Costa Vyana** e à **Profa. Maria Aparecida Gomes** do Laboratório de Amebíase, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG por todo o auxílio técnico pertinente às culturas de *G. lamblia*.

Aos técnicos da secretaria do programa pelo acolhimento dispensado durante minha permanência nesta instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPES/CNPq

Às **nutrizes** que gentilmente doaram a essência que seus recém-nascidos tanto necessitam, o colostro.

À **Dariane Castro Pereira** e **Valquiria Castro Pereira** pelo apoio e disponibilidade no acompanhamento nas etapas desse estudo.

Ao **Francisco Sastre Junior** e **Maria Eduarda Pereira Sastre**, sempre presentes, compreensivos e atenciosos às minhas necessidades e ansiedades acadêmicas no transcurso desta etapa.

À amiga **Rosaline Rocha Lunardi** pela motivação desde o processo seletivo até a fase de conclusão, pelas trocas e em especial pelo apoio. Admiro bom senso que a torna uma pessoa confiável e especial.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1 <i>Giardia lamblia</i>	13
1.2 Aspectos epidemiológicos na Giardíase.....	13
1.3 Morfologia.....	15
1.4 Ciclo biológico e transmissão.....	17
1.5 Patogênese e patogenicidade.....	18
1.6. Diagnóstico.....	20
1.7 Tratamento e profilaxia.....	22
1.8 Infecções por <i>G. lamblia</i> em crianças.....	24
1.9 Resposta imunológica para <i>G. lamblia</i>	25
1.10 Gestações tardias.....	26
1.11 Alterações fisiopatológicas na gestação tardia.....	28
1.12 Resposta imunológica e infecções parasitárias na gestação tardia.....	29
1.13 Gestações tardias e amamentação.....	31
1.14 Fatores imunológicos do colostro e do leite humano.....	32
1.15 Interações hormonais e células.....	34
2. Justificativa.....	39
3. Objetivo Geral.....	41
3.1 Objetivos específicos.....	41
4. Materiais e Métodos.....	42
4.1 Sujeitos e tamanho amostral.....	42
4.2 Critérios de inclusão, exclusão e descontinuidade.....	42
4.3 Definição das variáveis.....	43
4.3.1 Variáveis Independentes.....	44
4.3.2 Variáveis Dependentes.....	44
4.4 Métodos de coleta e avaliação.....	44
4.4.1 Obtenção de sobrenadante de colostro humano.....	44
4.4.2 Dosagem da concentração do cortisol no sobrenadante de colostro.....	45
4.4.3 Dosagem da concentração de melatonina no sobrenadante de colostro.....	45
4.4.4 Obtenção de células do colostro.....	46
4.4.5 Imunofenotipagem.....	46
4.4.6 Tratamento dos fagócitos do colostro com melatonina e cortisol.....	46
4.4.7 Parasito.....	47
4.4.8 Viabilidade dos parasitos em meio 199.....	47

4.4.9 Dosagem de ânion superóxido	47
4.4.10 Avaliação da fagocitose e da atividade microbicida	48
4.5 Aspectos Éticos	49
4.6 Análise Estatística	50
5. Resultados.....	51
5.1 Características antropométricas gestacionais das nutrizes	52
5.2 Características antropométricas dos recém-nascidos	54
5.3 Concentração de hormônios no sobrenadante de colostro.....	56
5.4 Imunofenotipagem de células do colostro	58
5.5 Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN e PMN em presença, ou não, de <i>G. lamblia</i> tratados, ou não, por hormônios.....	59
5.6 Índice de Fagocitose das células MN e PMN em presença, ou não, de <i>G. lamblia</i> tratados, ou não, por hormônios.....	63
5.7 Atividade Microbicida dos fagócitos MN e PMN em presença, ou não, de <i>G. lamblia</i> tratados, ou não, por hormônios.	66
6.Discussão	68
7.Conclusões.....	78
8.Referências	80
9.Anexos.....	99

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do cortisol.	35
Figura 2: Estrutura química da melatonina.	37
Figura 3: Concentração de cortisol (pg/mL) em colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias.	57
Figura 4: Concentração de melatonina (pg/mL) em colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias.	58
Figura 5: Índice de Fagocitose de células mononucleares (MN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratadas ou não pelos hormônios melatonina (MLT) e cortisol (Cort.) na presença de <i>G. lamblia</i>	65
Figura 6: Fagocitose por células polimorfonucleares (PMN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratadas ou não pelos hormônios melatonina (MLT) e cortisol (Cort) na presença de <i>G. lamblia</i>	65
Figura 7: Atividade microbicida pelos fagócitos mononucleares (MN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratados ou não pelos hormônios melatonina e cortisol na presença de <i>G. lamblia</i>	67
Figura 8: Atividade microbicida pelos fagócitos polimofonucleares (PMN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratados ou não pelos hormônios melatonina e cortisol na presença de <i>G. lamblia</i>	67

Lista de Tabelas

- Tabela I:** Caracterização antropométrica gestacional das nutrizes em diferentes faixas-etárias. 53
- Tabela II:** Caracterização antropométrica dos recém-nascidos de nutrizes em diferentes faixas-etárias. 54
- Tabela III:** Classificação do RN quanto à adequação de seu tamanho à idade gestacional de nutrizes em diferentes faixas-etárias. 55
- Tabela IV:** Classificação do RN quanto ao Apgar no primeiro e quinto minuto de vida por faixa etária materna. 56
- Tabela V:** Imunofenotipagem de células do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias. 59
- Tabela VI:** Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol). 60
- Tabela VII:** Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos PMN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol). .. 61
- Tabela VIII:** Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias em presença ou não de *G. lamblia*, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol). 61
- Tabela IX:** Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos PMN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias em presença ou não de *G. lamblia*, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol). 63

Resumo

As crianças são mais suscetíveis as doenças parasitárias e sua infecção pode ocorrer logo após o nascimento. A *Giardia lamblia*, (*G. lamblia*), é o principal causador de doenças diarreicas em crianças e apresenta distribuição mundial. Por outro lado, o colostro contém fatores protetores importantes para doenças diarreicas. Assim, a amamentação está associada à redução das taxas de diarreia, melhoria do estado nutricional e a ação imunoprotetora para a giardíase. As mudanças socioculturais e os avanços na medicina têm resultado na expansão do adiamento da gestação, o que tem sido associado à gravidez em idade avançada, aos seus efeitos perinatais adversos, provavelmente, devidos à influência de alterações hormonais típicas da fase climatérica. Na literatura, os hormônios melatonina e cortisol têm sido relatados como potentes imunomoduladores, porém, não foram encontrados dados referentes à atividade de fagócitos do colostro de nutrizes climatéricas, modulados por esses hormônios, na presença do parasito. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a concentração da melatonina e cortisol no sobrenadante de colostro e a atividade funcional de fagócitos da secreção de mulheres climatéricas, modulados por hormônios na presença de *G. lamblia*. Amostras de colostro foram coletadas de nutrizes, sendo incluídas nutrizes em idade reprodutiva (18 a 35 anos - grupo controle), nutrizes em fase de transição (36 a 39 anos) e nutrizes climatéricas (acima de 40 anos). Foram avaliadas a concentração de hormônios melatonina e cortisol no sobrenadante de colostro, a imunofenotipagem de células do colostro, a liberação de ânion superóxido pelos fagócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN); o índice de fagocitose das células MN e PMN em presença de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios e a atividade microbicida dos fagócitos MN e PMN. Observa-se que no colostro de nutrizes climatéricas há maior concentração de melatonina e cortisol. No colostro de mães climatéricas, houve redução do percentual de células, expressando marcadores CD14+ e CD15+. A melatonina aumentou a liberação de superóxido, tanto de fagócitos MN como PMN do colostro de mães, em fase de transição e climatéricas. Na presença de *G. lamblia*, houve menor liberação do ânion pelos fagócitos MN e PMN tratados por melatonina, enquanto que, em fagócitos tratados por cortisol, aumentou a liberação de superóxido na presença de *G. lamblia*. Houve aumento de fagocitose de *G. lamblia* pelos fagócitos MN de mães climatéricas. Os maiores índices de fagocitose foram observados em fagócitos MN e PMN de mães, em idade de transição. Os índices microbicidas para *G. lamblia* dos fagócitos MN de mães climatéricas foram menores, quando essas células foram tratadas por melatonina. Altos índices microbicidas para o parasito foram observados em fagócitos PMN de mães do grupo de transição e climatéricas. A atividade funcional dos fagócitos do colostro, modulados pelos hormônios cortisol e melatonina para *G. lamblia* de nutrizes com gestação de idade avançada, pode representar um mecanismo adicional de suma importância para a proteção e tratamento de infecções por parasitos.

Palavras chaves: *Giardia lamblia*. Colostro. Climatério. Fagócitos.

Abstract

Children are more susceptible to parasitic diseases and their infection may occur soon after birth. The *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) is the main cause of diarrheal diseases in children and has a worldwide distribution. Colostrum contains important protective factors for diarrheal diseases as well, breastfeeding is associated with reduction in diarrhea rates and improving the nutritional status and immunoprotective properties for giardiasis in newborns. The socio-cultural changes and advances in medicine resulted in the expansion of the postponement of pregnancy what has been associated with pregnancy in older. The adverse perinatal outcomes in these women, probably due to the influence of hormonal changes typical of climacteric period. In the literature, the hormones melatonin and cortisol have been reported as potent immunomodulators, but no data were found regarding phagocytic activity of colostrum whether nursing mothers modulated by these hormones in the presence of the parasite. So the aim of this study is to evaluate the concentration of melatonin and cortisol in the supernatant of colostrum and the functional activity of phagocytes secretion in climacteric women, modulated by hormones in the presence of *G. lamblia*. Colostrum samples were collected from nursing mothers. Nursing mothers being included in reproductive age (18 to 35 years - control group), nursing mothers in transition (36-39 years) and climatic nursing mothers (over 40 years). We evaluated the concentration of hormone melatonin and cortisol in the supernatant of colostrum, colostrum cell immunophenotyping, superoxide anion release by mononuclear phagocytes (MN) and Polymorphonuclear (PMN); the phagocytosis index of PMN and MN cells were evaluated in the presence of *G. lamblia* treated or not by hormones and the microbicidal activity of MN and PMN phagocytes in the presence of *G. lamblia* treated or not by hormones. We observed a greater concentration of melatonin and cortisol at the colostrum of nursing mothers. In the colostrum of mothers whether decreased the percentage of cells expressing CD14 + CD15 + marker and melatonin increased the release of superoxide both phagocytes MN as PMN colostrum of mothers in the process of transition and whether. In the presence of *G. lamblia*, a lower anion release by macrophages and PMN MN treated with melatonin, while phagocytes treated by increased cortisol release of superoxide in the presence of *G. lamblia*. There was an increase of phagocytosis of *G. lamblia* by MN phagocytes whether mothers. The highest rates of phagocytosis were observed in phagocytes MN and PMN mothers age of transition. Microbicides indexes for *G. lamblia* of MN phagocytes whether mothers were lower when these cells were treated by melatonin. High microbicides indexes for the parasite were found in phagocytes PMN mothers of the transition and climatic group. The functional activity of phagocytes colostrum modulated by hormones cortisol and melatonin to *G. lamblia* nursing mothers with older pregnancy may represent an additional mechanism of paramount importance to the protection and treatment of infections with parasites.

Key Words: *Giardia lamblia*. Colostrum. Climacteric. Phagocytes.

1. Introdução

1.1 *Giardia lamblia*

A infecção por *Giardia lamblia* em humanos foi relatada pela primeira vez por Anton Von Leewenhoek, em 1681 (Rópolo & Touz, 2010; Robertoson et al, 2010). O gênero *G. lamblia* possui seis espécies. Dentre essas espécies, somente uma é parasito de múltiplos animais, inclusive o humano, denominada *Giardia lamblia* (*G. lamblia*), também conhecida como *Giardia intestinalis* e *Giardia duodenalis* (Adam, 2001).

A *G. lamblia* é constituída por, pelo menos, sete grupos de genótipos (A-G), sendo que os genótipos A e B são encontrados em humanos e em vários mamíferos (Adam, 2001). Esse protozoário, eucarionte flagelado, infecta a porção superior do intestino delgado e causa doença diarreica (Geurden et al, 2010), sendo um dos parasitos com maior prevalência entre as infecções parasitárias humanas (Centeno-Lima et al. 2013).

1.2 Aspectos epidemiológicos na Giardíase

A giardíase é um problema de saúde pública de distribuição mundial, causada pelo protozário *G. lamblia*. É considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (Quihui et.al, 2010; Robertoson et al 2010; Sadeghi & Borji, 2015). Estima-se que cerca de 200 milhões de infecções ocorrem a cada ano na população mundial, sendo a maioria em crianças (Sadeghi & Borji 2015).

A resistência da forma infectante, cisto, no ambiente, contribui de forma direta à distribuição global da giardíase. Pode sobreviver por meses em locais úmidos e de temperatura baixa. Permanece viável por até 60 dias, sendo destruído por temperaturas superiores a 64°C (França-Botelho et al., 2006; Silva, 2014; Santana, et al., 2014). As

variações ambientais micro e macroclimáticas têm impacto sobre a epidemiologia desta parasitose intestinal, visto que as mudanças climáticas tais como, o aumento da precipitação e da umidade e a diminuição da temperatura, são favoráveis à viabilidade do cisto em relação ao clima, e à incidência da doença (Escobedo et al. 2015).

A investigação epidemiológica realizada em diferentes países mostrou que a falta de serviços essenciais influencia na disseminação. A pobreza, o analfabetismo, a falta de higiene, a falta de acesso à água potável, e um clima tropical quente e úmido são os fatores comuns atribuídos na prevalência desses parasitos intestinais (Alum et al, 2010; Silva, 2014).

A incidência de giardíase é maior em países em desenvolvimento devido à estrutura sanitária ser incipiente. Entretanto, é re-emergente em países desenvolvidos, constatado por surtos em creches e por veiculação hídrica (Robertson, et. al, 2010). Entre os anos de 2004 e 2010, houve registro de, pelo menos, 199 surtos documentados de doenças provocadas por protozoários em humanos com transmissão por via hídrica (Baldursson & Karanis, 2011). Cerca de 46% dos surtos ocorreram no continente australiano, 30,6% na América do Norte e 16,5% na Europa. Há falta de um sistema de registro sistemático, acerca da giardíase nos países em desenvolvimento. Pouco se sabe sobre surtos nesses locais, impossibilitando uma visão mais clara sobre os índices epidemiológicos (Silva, 2014).

No Brasil, devido ao clima tropical e à importância da água na transmissão da giardíase, o Ministério da Saúde, de acordo com a Portaria n° 2.914/2011, inclui o monitoramento de cistos de *G.lambli*a nos locais de captação de água como procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e padrão de potabilidade (Brasil, 2011).

1.3 Morfologia

A *G. lamblia* possui duas formas morfológicas: cistos e trofozoítos. O cisto é a forma infectante e resistente, responsável pela transmissão. Podem ser redondos ou elípticos, medindo de 12 a 15 μm de comprimento e 6 a 8 μm de largura. Eles contêm núcleos, axonemas e um corpo mediano. No citoplasma se encontram de dois a quatro núcleos, axonemas que originam os flagelos no trofozoíto e corpos escuros com forma de meia-lua precursores do disco adesivo na forma vegetativa (Carvalho 2012; Vieira et al. 2012; Fava 2013; Rodas 2014; Silva 2014)

Apresenta uma parede cística dupla, glicoproteica, formada por um polímero de $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-galactosamina, com espessura entre 0,3 e 0,5 μm (Adam, 2001; Viana & Sogayar, 2011). Essa parede é responsável pela maior resistência a variações de temperatura, de umidade e alguns processos convencionais de tratamento de água, podendo sobreviver por muito tempo em um ambiente úmido. Devido a seu tamanho reduzido, pode ocorrer sua passagem em barreiras físicas, como filtros (Smith, 2006; Rodas, 2014; Silva, 2014), o que contribui para o aumento de infecções por esses parasitos.

As formas trofozoítas apresentam 10-20 μm de comprimento e 5-15 μm de largura, com a forma de uma gota, quando observadas dorsalmente ou ventralmente. Observa-se um disco adesivo côncavo na porção ventral, quatro pares de flagelos, dois axonemas e um corpo mediano. Possui dois núcleos simétricos localizados anteriormente. O citoesqueleto inclui um par de corpos medianos, cuja morfologia é utilizada na diferenciação de algumas espécies; quatro pares de flagelos, sendo um par anterior, um par posterior, um par caudal e um par ventral; e um disco ventral, também, conhecido como adesivo ou suctorial, importante na fixação do parasito no intestino (Tashima et al., 2009).

Dentre as proteínas do citoesqueleto, encontram-se as giardinas, que compreendem um grupo de 23 proteínas ácidas, divididas em três grupos: alfa, beta e gama. No citoplasma, encontram-se vacúolos lisossomais, ribossomais e grânulos de glicogênio. O trofozoíto é a forma móvel desse parasito. Ele se aloja no intestino delgado, sendo o responsável pelas manifestações clínicas da infecção e pode ser encontrado em fezes diarreicas (Gillin et al., 1996; Adam, 2001; Thompson, 2004; Viana & Sogayar, 2011; Santana, 2014; Rodas, 2014).

1.4 Ciclo biológico e transmissão

O ciclo biológico da *G.lamblia* é monoxênico, apenas um hospedeiro definitivo. Após a ingestão, o cisto passa por um processo de desencistamento, que tem início no meio ácido do estômago e completa-se no meio alcalino do duodeno e jejuno, formando trofozoítos, os quais se multiplicam por divisão binária longitudinal.

O crescimento dos trofozoítos pode ser favorecido por sais biliares e colesterol. Essas substâncias promovem a colonização dos parasitos no duodeno e jejuno, onde permanecem aderidos à mucosa, por meio do disco adesivo. Embora a molécula de colesterol contribua para a sobrevivência e replicação, as formas trofozoítas da *G. lamblia* não são capazes de sintetizá-la, sendo preciso obtê-las do ambiente externo. Um receptor com características da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), responsável pelo reconhecimento e internalização de lipoproteínas, foi identificado em *G. lamblia*, mostrando a capacidade de sobrevivência desse parasito em ambientes distintos (Prucca et al. 2011)

O ciclo celular dura entre seis a 20 horas, e se completa no ceco pelo processo de encistamento do trofozoíto, ao final do qual são produzidos novos cistos que são excretados juntamente com as fezes do hospedeiro (cerca de 300 milhões a 14 bilhões por dia). Durante o processo de eliminação, podem ocorrer períodos de interrupção de sete a 10 dias. Os trofozoítos também podem estar presentes nas fezes, mas são os cistos os responsáveis pela contaminação do ambiente e pela transmissão por via oral a um hospedeiro susceptível (Rodas, 2014; Silva, 2014; Santana, et al., 2014).

A falta de tratamento adequado da água e o déficit de saneamento básico potencializam a transmissão da *G. lamblia*. Essa contaminação pode ser pessoa-pessoa e

fecal-oral, a partir dos cistos na água e nos alimentos, nas mãos não higienizadas e no transcorrer da atividade sexual. A transmissão direta de pessoa a pessoa tem importância, principalmente, na disseminação do parasito entre crianças que frequentam creches e escolas, onde uma criança contaminada pode ser a fonte de transmissão, além de contaminar o ambiente (Thompson, 2000). A infecção ocorre pela ingestão de pelo menos de 10 cistos de *G. lamblia* (Júlio et al.2012).

1.5 Patogênese e patogenicidade

Os fatores de risco atribuídos à giardíase ainda não estão completamente elucidados. A maioria das infecções por *G. lamblia* em humanos é assintomática, mas algumas se tornam agudas ou crônicas. Essa variabilidade em relação ao desenvolvimento da doença tem sido atribuída a diversos fatores, que envolvem tanto o hospedeiro como o próprio parasito (Faubert, 2000).

Em relação ao hospedeiro, fatores como estado nutricional, a hipocloridria, deficiência de imunoglobulinas na mucosa intestinal e idade são considerados importantes no desenvolvimento da doença, enquanto que a virulência e o genótipo do parasito, interferem, de forma direta, no processo patológico da giardíase (Fava, 2013; Rodas, 2014; Santana, et al., 2014).

Os fatores de virulência da *G. lamblia* têm sido pouco identificados, mas os principais mecanismos de patogenicidade incluem moléculas envolvidas na adesão, encistamento e variação antigênica (Ankarklev et al., 2010).

A variação antigênica é um mecanismo adaptativo utilizado pelo parasito para enfrentar o ambiente hostil do intestino delgado e evadir o sistema imune do hospedeiro. Na *G. lamblia*, esse processo permite uma contínua mudança de antígenos

de superfície altamente imunogênicos, chamados de proteínas variantes de superfície (VSPs), que recobrem toda a superfície do parasito, incluindo o disco ventral e flagelos. A família VSP compreende, aproximadamente, 200 genes e apenas um gene é expresso na superfície do parasito, a qualquer momento, sendo que a mudança de VSPs ocorre, espontaneamente, a cada 6-13 gerações (Nash, 2001; Dubois et al., 2008; Vieira et al., 2012)

A indução da apoptose no enterócitos pela *G. lamblia* representa um componente importante na patogênese desta infecção (Cotton et al., 2011). Pacientes com giardíase crônica apresentam alteração nas células epiteliais, associada a aumento na taxa de apoptose de enterócitos. A diarreia causada durante a infecção por esse parasito seria resultado de uma alteração no epitélio intestinal que causaria má-absorção de sódio e glicose, além de hipersecreção de cloro (Troeger et al. 2007).

Conforme a vulnerabilidade do hospedeiro e a virulência do parasito, pode ocorrer irritação na mucosa intestinal com aumento na produção de muco e redução da atividade de enzimas intestinais. Associado a esse quadro, ocorre menor absorção de vitaminas lipossolúveis, de ácidos graxos, de vitamina B12, de ácido fólico e de ferro (Santana, et al., 2014), atrofia das vilosidades e danos nas microvilosidades intestinais; o aumento da permeabilidade epitelial e inflamação da mucosa (Fava, 2013).

As manifestações clínicas provocadas pela giardíase são complexas (Fernandes et al. 2014). Embora seja uma infecção de fácil tratamento, a sintomatologia prolongada pode gerar impacto significativo na qualidade de vida do indivíduo (Robertson, et. al, 2010).

Na infecção aguda há aparecimento súbito de diarreia, flatos, distensão abdominal, ocasionalmente, pode ocorrer febre; na infecção crônica ocorre a má

absorção intestinal de gordura, xilose, ácido fólico, vitaminas lipossolúveis e B12. Há náuseas, vômitos, inapetência, perda de peso, e em criança o aumento de peso é deficitário (Durán et al, 2010; Robertoson et. al, 2010; Wright, 2012). Em crianças menores de 5 anos, a infecção pode causar diarreia aguda grave, e nas infecções crônicas pode resultar em perda de peso e atraso no crescimento (Centeno-Lima et al. 2013).

A infecção, causada pela *G. lamblia*, em indivíduos imunocompetentes dá-se de forma autolimitada, e em indivíduos imunossuprimidos, ocorre diarreia persistente e má absorção severa (Abdel-Hafeez et al ,2012).

1.6. Diagnóstico

O diagnóstico da giardíase, inicialmente, é baseado em sinais e sintomas clínicos inespecíficos. É confirmado pela presença de cistos, trofozoítos ou antígeno de *G. lamblia*, em qualquer amostra de fezes ou fluido duodenal. O diagnóstico, a partir da pesquisa de cistos e trofozoítos, apresenta significativa frequência de resultado falso negativo, devido à intermitência da eliminação e à baixa especificidade de alguns testes. (Júlio et al., 2012; Rodas, 2014; Santana et al., 2014).

Presença de cisto, em fezes formadas, é detectada por meio do exame microscópico, seja direto (a fresco) ou precedido por métodos de concentração como o Faust (centrifugo-flutuação em solução concentrada de sulfato de zinco) e a sedimentação por centrifugação. Os esfregaços podem ser corados com hematoxilina férrica ou iodeto de lugol, sendo este último o mais utilizado (Viana & Sogayar, 2011).

Os trofozoítos são pesquisados, em fezes líquidas, direto a fresco ou hematoxilina férrica. Como os trofozoítos são destruídos no meio externo em 15 minutos, é conveniente conservar as fezes com o conservante de Schaudinn ou MIF (Santana et al., 2014).

A microscopia tem como vantagem a detecção simultânea de vários parasitos, o baixo custo e a facilidade de execução. Há um consenso de que a análise microscópica apresenta melhor sensibilidade quando são examinadas três amostras coletadas em dias alternados (Nazer et al., 1993; Hiatt et al., 1995; Cartwright, 1999; Silva, 2014) .

Testes como ELISA e imunofluorescência indireta mostram alta sensibilidade e especificidade, porém, devido ao alto custo, não têm sido muito utilizados no Brasil. A detecção de anticorpos anti-*Giardia* no soro tem pouca contribuição para o diagnóstico (Guimarães & Sogayar, 2002). Estudos utilizando essas técnicas para a detecção de anticorpos séricos anti-*Giardia* e detecção de antígenos nas fezes, revelam que esses testes diagnósticos apresentam alta prevalência de soropositividade, sendo esses resultados atribuídos às possíveis reações cruzadas ou exposição prévia à *G. lamblia* (Guimarães & Sogayar, 2002; Fernandes et al., 2014)

A detecção de coproantígeno é uma boa alternativa no diagnóstico da *Giardia lamblia*, devido a alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, não detectam outros parasitos, simultaneamente, e apresentam um custo elevado em relação ao exame parasitológico de fezes (Silva, 2014).

Além do ELISA, têm surgido novos testes imunológicos para pesquisa de coproantígenos de *G. Lamblia*, que visam rapidez e praticidade no diagnóstico, utilizando imunocromatografia, como o ImmunoCard STAT (Meridian Bioscience, Inc.) e o Triage (BIOSITE Diagnostics, San Diego, EUA) (Elsafi et al., 2013).

Tanto o método convencional, por concentração e microscopia, quanto o imunoenensaio por ELISA, apresentam menor índice de detecção para *G. lamblia*, comparada ao método molecular por PCR (Cardona et al. 2014). Apesar das vantagens, as ferramentas de biologia molecular não têm sido utilizadas no diagnóstico rotineiro das parasitoses, por demandar aparelhagem e reagentes caros (Silva, 2014).

A análise do fluido duodenal ou de fragmentos de biopsia jejunal pode ser considerada como um recurso extra no diagnóstico da *G. lamblia* (Viana & Sogayar, 2011). Também achados radiológicos (edema, segmentação do intestino delgado), resultado anormal no teste de tolerância à lactose, nível ausente de IgA secretória, hipogamaglobulinemia ou acloridria podem somar para o diagnóstico da doença (Heller et al., 2004; Centeno-Lima et al., 2013; Cardona et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Silva, 2014; Santana, et al., 2014).

1.7 Tratamento e profilaxia

De todas as drogas anti-giardíase disponíveis, as mais amplamente utilizadas têm sido os nitroimidazóis, particularmente, o metronidazol e os benzimidazóis, como o albendazol (Carvalho 2012).

Quanto ao albendazol, estudos clínicos e in vitro têm fornecido resultados conflitantes, pois a suscetibilidade in vitro de trofozoítos de *G. lamblia* ao albendazol apresenta-se inferior àquela observada pelos nitroimidazóis (Gardner & Hill, 2001). Dessa maneira, o albendazol apresenta efetividade similar a do metronidazol e menos efeitos colaterais, com a vantagem de ser administrado em regimes posológicos mais simplificados (Granados et al. 2012).

O metronidazol mostra-se efetivo apenas sobre as formas trofozoíticas. Portanto, cistos viáveis continuam sendo excretados para o ambiente durante o tratamento (Rayan et al., 2005).

Na literatura, estudos avaliando efeito *in vitro* de inibidores de proteases sobre protozoários sugerem que concentrações micromolares de inibidores sintéticos de proteases, especialmente, aqueles específicos para cisteína-proteases, atuam, efetivamente, sobre a multiplicação, a capacidade de adesão, a viabilidade e a ultraestrutura dos trofozoítos de *G.lamblia*. Considerando que esses são fatores indispensáveis para a sobrevivência do parasito e para o estabelecimento da infecção no intestino delgado do hospedeiro, esses estudos parecem promissores como alternativa terapêutica viável no controle da infecção por *G. lamblia* (Carvalho, 2012).

Na alternativa de evitar a resitencia do parasito, Busatti et al (2013) demosntrou que os análogos do metronidazol são compostos eficientes para o tratamento de *G. lamblia* pois, foram capaz de reduzir a carga parasitária ao gerar mudança na arquitetura celular com desorganização evidente. A excelente actividade giardicida *in vivo* e *in vitro* demonstram que estes derivados de nitroimidazol pode ser importante terapêutico no combate à giardíase (Busatti et al 2013).

A profilaxia da gardíase é um desafio para a saúde pública, que precisa ter êxito visando reduzir as áreas endêmicas, a sua frequência, o impacto no sistema de saúde e na vida das pessoas. Acredita-se que possam ser alternativas viáveis: ações governamentais de prevenção, tal como o tratamento e monitoramento da potabilidade da água, possibilitar condições sanitárias adequadas à coleta e processamento do esgoto, somadas a ações de educação em saúde, bem como higiene pessoal e alimentar. O

tratamento da giardíase deve ser efetivo, a fim de prevenir a transmissão pessoa a pessoa e, assim, diminuir a ocorrência da giardíase em áreas endêmicas.

1.8 Infecções por *G. lamblia* em crianças

As infecções por *G. lamblia* são mais comuns em crianças, com prevalência de aproximadamente 20% em algumas regiões brasileiras, sendo considerada uma das parasitoses mais frequentes em países em desenvolvimento (Rivera et al., 2002; Pereira et al., 2007). Estudos conduzidos em diferentes estados do Brasil relatam a prevalência da giardíase em crianças, que varia de 16% a 27,5% (Machado et al., 2008; Menezes et al., 2008; Tashima et al., 2009).

A resposta imunológica aumenta com a idade e exposição ao parasito (Júlio et al., 2012). Em estudos realizados em crianças de 0 a 6 anos, o parasito de maior prevalência foi a *G. lamblia* (Zaiden, et al, 2005; Fernandes & Barbosa, 2011; Júlio et al, 2012), sendo que há maior risco de infecção por este parasito em crianças, após o primeiro ano de vida (PEREIRA et al., 2007).

As crianças infectadas por *G. lamblia* estão propensas a déficit de crescimento e desenvolvimento cognitivo (Robertson et. al, 2010; Wright, 2012). A alta incidência de diarreia causada pelo parasito, nos primeiros dois anos de vida, revelou impacto, a longo prazo, como associação de diarreia infantil à redução de funções cognitivas e déficit de crescimento (Niehaus et. al, 2002). Duas, ou mais infecções por *G. lamblia*, até os dois anos de idade, foi associada a 4.1 pontos abaixo no escore da escala de inteligência Wechsler (Berkman et al.,2002). Também, em crianças portadoras de

doença hepática crônica, a *G. lamblia* foi o terceiro protozoário intestinal mais prevalente (El-Shazly et al. 2015).

1.9 Resposta imunológica para *G. lamblia*

A infecção por *G. lamblia* pode produzir imunidade, embora não esteja esclarecido se a infecção prévia pelo parasito, realmente, evita uma segunda infecção, ou apenas, evita os sintomas severos da doença (Solaymani-Mohammadi et al. 2010).

Vários mecanismos de defesa têm sido propostos para eliminar a infecção por *G. lamblia*, incluindo fagocitose por macrófagos, secreção de defensinas, óxido nítrico e mucinas nas células epiteliais, além do recrutamento e ativação de mastócitos nas células da mucosa intestinal (Solaymani-Mohammadi et al. 2010). Em humanos, macrófagos tanto do sangue como do colostro são capazes de fagocitar trofozoítos de *G. lamblia* (Hill e Pearson 1987, França-Botelho et al. 2006) e apresentam atividade microbicida *in vitro* (França-Botelho et al. 2006).

Hospedeiros imunocompetentes desenvolvem respostas inatas e adquiridas eficientes para evitar ou restringir o parasitismo (Rópolo & Touz, 2010). Pode ser autolimitada, em alguns casos (Robertson et al. 2010), indicando a presença de mecanismos de defesa eficientes para esse parasito intestinal. A resposta imune mediada por células T e B é considerada um importante mecanismo de controle deste protozoário.

Vários estudos clínicos e experimentais visam identificar antígenos específicos para *G. lamblia*, estimulados pelas células B. Antígenos liberados pela *G. lamblia* são os principais responsáveis pela ativação da resposta imune do hospedeiro, que é,

frequentemente, caracterizada por uma inflamação mínima na mucosa intestinal. Essa resposta imune, na maioria dos casos, parece ser protetora e é mediada, sobretudo, por Imunoglobulina A (IgA), importante nos casos de infecção crônica (Munhoz-Cruz, et al., 2010; Souza et al., 2012). No entanto, nota-se que os anticorpos não são necessários para o controle da infecção aguda (Singer & Nash, 2000).

As informações sobre antígenos de *G. lamblia*, que induzem a resposta imunológica celular são escassas (Singer & Nash, 2000; Astiazaran-Garcia et al., 2009). Existem diversos tipos de linfócitos T efetores. Classicamente, os dois principais tipos são os auxiliares (Th) e os citotóxicos, que podem ser diferenciados por marcadores específicos e pelas funções (Mesquita et al., 2009).

Também os níveis de citocinas, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-5 (IL-5), interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ), apresentam-se mais elevados em pacientes infectados com *G. lamblia* do que em indivíduos saudáveis, o que sugere ação dessas citocinas na imunidade para giardíase (Bayractor et al., 2005).

Estudo experimental revelou que a IL-6 e o TNF- α são consideradas pró-inflamatórias e auxiliam no recrutamento de macrófagos e neutrófilos no sítio de inflamação, sendo as citocinas de maior impacto na giardíase (Zhou et al., 2007). No entanto, a infecção por *G. lamblia*, seja em humanos ou animais, não apresenta infiltração significativa de neutrófilos ou macrófagos. Uma resposta regulatória no trato intestinal pode estar ativa durante a infecção, inibindo uma inflamação severa (Roxström et al., 2006; Solaymani-Mohammadi, 2010).

1.10 Gestações tardias

As alterações imunitárias que ocorrem durante a gravidez são ainda pouco compreendidas (Vasconcellos et al. 2003), porém a influência da idade materna, no momento do parto, tem assumido uma importância crescente nas últimas décadas (Cohen 2014), tanto do lado materno, como do recém-nascido.

As gestações de mulheres com idade superior a 35 anos são denominadas tardias e as aquelas com mais de 45 anos são consideradas gestações com idade materna muito avançada (Huang, 2008), também, denominada de extremo de idade reprodutiva (Cleary-Goldman et al. 2005).

A ascensão do feminismo proporcionou melhores oportunidades educacionais e escolhas profissionais mais amplas para as mulheres, postergação do casamento, a constituição de famílias pequenas e, de novas uniões; a combinação dessas tendências sociais, com a disponibilidade de controle de natalidade eficaz e tratamentos sofisticados para a infertilidade, tem resultado na expansão do adiamento da gestação para o polo oposto da idade reprodutiva (Gravena et al., 2012; Cohen, 2014).

O climatério é uma fase do ciclo vital feminino, caracterizado pela transição da idade reprodutiva para a idade não reprodutiva. As alterações iniciam a partir dos 40 anos (Pereira & Siqueira 2009a; Pereira & Siqueira 2011; Salazar-Molina et al. 2015; Pereira & Siqueira 2009b). É nesse período de alterações, em função da instabilidade hormonal, no período pré-menopausal, que as climatéricas engravidam. Dessa maneira, têm-se gestações tardias e com idade materna muito avançada (Huang, 2008; Pereira & Siqueira, 2009a).

A influência da idade materna tem assumido uma importância crescente nas últimas décadas (Cohen 2014). Segundo dados preliminares do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC), no ano de 2013, no Brasil, 65.615 climatéricas entre

40 e 65 anos deram a luz a recém-nascidos vivos. A maior incidência foi na região sudeste (45,85%), seguidos da nordeste (24,79%), sul (15,22%), norte (7,37%) e centro-oeste (6,74%). A taxa de prematuridade, o baixo peso ao nascer e a restrição de crescimento fetal são mais altas entre as gestantes com mais de 40 anos (Andrade et al., 2004; Cleary-Goldman, 2005; Benzies, 2008).

1.11 Alterações fisiopatológicas na gestação tardia

As mulheres climatéricas têm mais doenças, comparadas com as mais novas. Doenças crônicas, diabetes, hipertensão, obesidade e doença renal são algumas das comorbidades associadas à idade. Além disso, desenvolvem mais comumente pré-eclâmpsia, placenta prévia e diabetes gestacional. Ainda que saudáveis, as gestantes climatéricas têm gestações com maior risco, em comparação com mulheres mais jovens (Cohen 2014).

Gestantes com idade superior a 35 anos apresentam maior frequência de resultados perinatais adversos, quando comparadas as mulheres com idade entre 20 e 34 anos, com destaque para RN com baixo peso e macrossomia, prematuros e pós-termo, com índice de Apgar menor que 7 no 1º e 5º minutos de vida, além da presença dos óbitos fetais (Gravena et al. 2012). Ainda, apresentam maior ocorrência de abortamentos espontâneos e induzidos e maior risco para mortalidade perinatal, baixa vitalidade do recém-nascido, baixo peso ao nascer, parto pré-termo e fetos pequenos para idade gestacional (Delpisheh et al, 2008). As alterações mais frequentes de peso do recém-nascido nessas mulheres envolvem tanto os casos de macrossomia, quanto os pequeno para a idade gestacional (Azevedo, et al., 2002). A taxa de prematuridade, o

baixo peso ao nascer e a restrição de crescimento fetal são mais altas entre as gestantes com mais de 40 anos (Andrade et al., 2004; Cleary-Goldman, 2005; Benzies, 2008).

A idade pode conferir uma proporção crescente de risco ao longo da vida reprodutiva. Uma gestação de baixo risco precisa da coordenação de eventos genéticos, bioquímicos, imunológicos e endócrinos. Recém-nascidos de climatéricas são mais propensos a necessitar de cuidados intensivos e a terem anomalias (Cohen, 2014; Vaughan et al., Cleary & Murphy; 2014; Klemetti et al. 2014).

1.12 Resposta imunológica e infecções parasitárias na gestação tardia

As alterações imunitárias na gestação tardia se associam a respostas imunológicas para fatores aloimunes e autoimunes (Vasconcellos et al. 2003; Caetano et al. 2006) e doenças parasitárias (Caetano et al. 2006). A ocorrência de aborto espontâneo na idade acima de 40 anos está diretamente associada a fatores autoimunes (Caetano et al. 2006), enquanto que infecções parasitárias como doença de Chagas, toxoplasmose e malária foram associadas à morte fetal (Cecatti & Aquino 1998).

Na literatura, estudo investigando parasitos intestinais em gestantes de diferentes faixas-etárias, revelou maior prevalência (48,1%), no grupo etário entre 23-31 anos, predominância (86%) de protozoários. Porém, estudos sobre a giardíase e sua interface com o período gestacional em idade avançada não foram encontrados (Rodríguez-García, 2002).

Devido à patogenicidade e prevalência de infecções por *G. lamblia*, é possível que este grupo de gestante seja mais susceptível à infecção pelo parasito, e esta pode ocasionar efeitos durante a gestação e no período de aleitamento materno.

Pode-se inferir que a diarreia causada durante a infecção, a alteração no epitélio intestinal causam má-absorção de nutrientes e esses fatores seriam corresponsáveis pelo baixo peso ao nascer e a restrição de crescimento fetal. A letalidade por giardíase está ancorada na mortalidade infantil por doenças diarreicas. Assim, torna-se importante avaliar componentes imunológicos presentes no colostro de mulheres climatéricas e verificar os efeitos destes componentes, diretamente, para *G.lambli*a, uma vez que as crianças são infectadas por parasitos, praticamente, logo em seguida ao nascimento, tendo continuidade em alguns casos durante a sua vida (Fernandes & Barbosa, 2011).

Por outro lado, há evidências de que o hipoestrogenismo, característico da fase climatérica, possa resultar em menor resistência às infecções. As defesas imunes naturais do organismo também são reduzidas, em certa proporção, por causa da fragilidade da pele e da diminuição na produção de anticorpos pelas mucosas (Medeiros et al., 2007) e refletem em alterações celulares e humorais em todo o processo de geração de resposta específica.

As modificações da resposta imune humoral com a idade incluem: menor resposta ao reconhecimento de antígenos; aumento na produção de autoanticorpos e complexos imunológicos circulantes; diminuição na produção de interleucina 4 (IL-4); aumento na secreção de interferon- γ (IFN- γ) e diminuição na síntese de imunoglobulinas (Miller, 1996). A resposta imunológica celular também diminui com a idade e resulta em reação retardada aos antígenos de memória e declínio na função dos linfócitos B (Straub et al, 2001). Alterações na relação CD4/CD8, também, foram descritos em mulheres idosas, mas parece não ocorrer mudança em macrófagos, células dendríticas ou linfócito B (Miller, 1996).

1.13 Gestações tardias e amamentação

Esses resultados perinatais adversos, resultantes da gestação tardia e de idade materna muito avançada, podem ser amenizados com o aleitamento materno, pois este é ideal para crescimento e desenvolvimento do recém-nascido, devido à disponibilidade de nutrientes e componentes imunológicos. O leite materno é capaz de suprir a deficiência do sistema imunológico imaturo dos recém-nascidos, especialmente, nas superfícies de mucosas (França et al., 2012).

O leite humano é rico em anticorpos, em especial, IgA secretora (sIgA) (Newburg, 2005; Hanson, 2007; Morceli et al., 2011; Santana, et al., 2014), que desempenham um papel protetor para vários micro-organismos (Honorio-França et al., 1997; França-Botelho et al., 2006). Crianças amamentadas podem obter proteção por meio de anticorpos da classe IgA secretória, presentes no leite materno (Santana, et al., 2014), devido à capacidade desta imunoglobulina neutralizar micro-organismos na mucosa intestinal (Santos et al., 2013).

Outros isotipos de imunoglobulinas, como IgG e IgM, fornecem proteção complementar na mucosa respiratória e trato gastrointestinal do recém-nascido. (Islam et.al, 2006). Proteínas, C3 e C4, do sistema complemento também estão presentes no colostro em quantidades menores que no sangue. As referidas proteínas atuam como opsoninas, sendo importantes na fagocitose e na atividade microbicida (Honorio-França et al, 1997; Honorio-França 2001).

A amamentação, entre outras ações, tem sido associada à redução das taxas de diarreia e melhoria do estado nutricional (Moore et al., 2000; Niehaus et al., 2002; Santos et al., 2013). Estudos têm demonstrado que o colostro e o leite humano contêm

fatores protetores importantes para combater doenças diarreicas em crianças (Honório-França et al., 1997; França-Botelho et al., 2006).

1.14 Fatores imunológicos do colostro e do leite humano

O colostro difere da maioria das outras secreções por apresentar um grande número de leucócitos viáveis 1×10^9 cel/ml, durante os primeiros dias de lactação (Islam et al., 2006). Neutrófilos e macrófagos são as células mais numerosas presentes na secreção. Essas células permanecem viáveis no intestino mucosa do recém-nascido por um período de cerca de quatro horas, após a amamentação (Hughes, 1988). Assim, possui capacidade de prevenir doenças diarreicas, visto que os componentes imunológicos, originários do aleitamento materno, tornam-se presentes no intestino do recém-nascido (Caspari et al, 1993).

Macrófagos do colostro têm atividade fagocitária, receptor de SIgA (Robinson et al 1991; Rivas et al 1994.). São capazes de produzir radicais livres derivados do oxigênio (Tsuda et al, 1984; Honório-França et al, 1997; França et al, 2011) contém IgA de superfície (França et al, 2011b) e IgA intra-citoplasmática (Brandtzaeg, 2003). São descritos como produtores de fatores de imunomoduladores e expressam marcadores de ativação como CD11c e podem modular a função de linfócitos B e T (Rivas et al., 1994).

Os neutrófilos, por sua vez, quando não estimulados, apresentam menor atividade funcional (Thorpe et ai, 1986; França et al, 2009) expressam receptor Fc α R (Isoforma a.1) sem associação da subunidade γ e apresentam menor atividade microbicida e, provavelmente, atuam como mediadores anti-inflamatórios (Honório-França, 2001).

Devido a sua menor atividade funcional, uma vez secretado no leite, acredita-se que a principal função do neutrófilo está associada a efeitos maternos protetores para a criança (Field, 2005). A expressão de altos níveis de CD11c e baixos de L-selectina indica que são células, previamente, ativadas (Kim et al., 2004).

A ação imunoprotetora de células para a giardíase foi demonstrada por meio da microscopia eletrônica de contraste de fase, sendo evidenciada a capacidade de fagocitose dos macrófagos derivados do sangue humano em relação a *G. lamblia* (Hill & Pearson, 1987). No colostro, a atividade fagocitária das células parece sofrer influência de opsoninas para aderência, ingestão e morte de trofozoítos de *G. lamblia*, uma vez que esses fagócitos aumentam a capacidade de ingestão e morte do *G. lamblia* na presença de imunoglobulinas e do proteínas C3 e C4 do sistema complemento (França-Botelho et al, 2006), o que sugere que esses fagócitos atuam como um mecanismo adicional de proteção para giardíase infantil.

Mães com giardíase têm em seu leite IgA secretora anti-giardia e seus filhos têm menor incidência de giardíase (Wlak, 1998; Bilenko et al, 2008). A maioria dos indivíduos se recupera da giardíase aguda, mas alguns sofrem de diarreia crônica recorrente, que persiste dois anos ou mais (Fabregas et al, 1978; Gomez 1981). As crianças nascidas de mães não imunes correm risco, significativamente, maior de adquirir *G. lamblia* e desenvolver giardíase com sintomas mais graves em comparação com filhos de mães, previamente, sensibilizadas ao parasito (Tellez et al 2005).

Além de células, o colostro apresenta ainda componentes bioativos como as citocinas (Meki et al, 2003; Lönnerdal, 2003; Kverka et al, 2007; Garofalo, 2010), lisozima (Lönnerdal, 2003; Marek et al, 2003), probióticos (Newburg, 2005), fatores antioxidante (Friel et al, 2008; Lindmark-Mansson & Akesson, 2000), glucanas

(Newburg, 2005) como lactoaderina (Shahriar et al, 2006; Marek et al, 2003), lactoferina (Ogundele et al, 2000; Bessler et al, 2006) e transferrina (Goldman, 1993, Goldman 2002) entre outros componentes produzidos pelo sistema imune materno. Possui, também, vários hormônios (Miralles et al, 2006; Lönnnerdal, 2000; Abdulla et al, 2005, Lamounier et al, 2001; Fagundes et al, 2012, Hara et al, 2013, Honorio-França et al, 2013).

As grandes quantidades de células e de outros componentes solúveis no colostro, capazes de modular a atividade funcional dessas células, sugerem que o colostro e leite humanos possuem componentes importantes, que são capazes de atuar em infecções, em especial as parasitárias.

1.15 Interações hormonais e células

A literatura reporta a importância de hormônios como potentes imunomoduladores, que participam de vários aspectos relacionados ao sistema imunológico (Kuhlwein et al., 2001; Corrêa et al, 2006).

Interações entre hormônios, envolvendo a ativação de células imunocompetentes, têm sido relatadas. A presença de fagócitos no colostro e outros fatores no leite humano, incluindo hormônios (Crago et al., 1979; Goldblum & Goldman, 1994) pode estar associados com a evidência clínica e epidemiológica que o aleitamento materno protege as crianças para infecções agudas gastrointestinais e respiratórias (Cunningham et al., 1991; Carlsson & Hanson, 1994).

Existem autores que reportam um mecanismo de interação entre células e a modulação pelo hormônio cortisol (Long et al., 2005; Lim et al., 2007; Fagundes et al,

2012), enquanto outros pelo hormônio melatonina (Hara et al, 2013, Honorio-França et al, 2013).

O cortisol (figura 1) é um hormônio produzido na glândula adrenal e é o principal marcador para a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Tsigos et al., 2002). Esse hormônio é utilizado como um biomarcador em muitos estudos de estresse fisiológico (Chida, 2009). Tem uma característica e ritmo biológico estável em turno diurno com um aumento de sua liberação 30 min após o despertar (Haus et al., 2006), sendo considerado um bom marcador de ritmo diurno (Hofstra et al., 2008).

Os glicocorticóides desempenham um papel fundamental na consolidação de memória de um evento estressante e, assim que esse evento reaparecer novamente no futuro, este pode desempenhar uma resposta mais efetiva (Roosendaal et. al., 2009). O hormônio cortisol é um glicocorticóide capaz de regular a mobilização energética e a função imunológica (Reul, et. al., 2007).

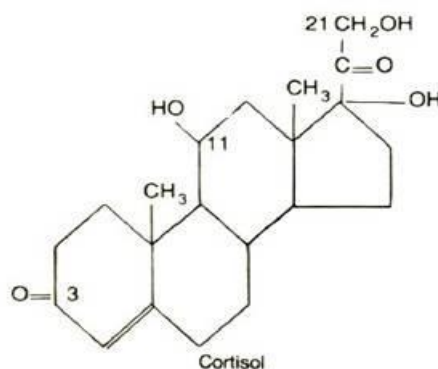


Figura 1 Estrutura química do cortisol (Gayton,1997).

O cortisol está presente no colostro (Fagundes et al. 2012), e tem sido reportado com importante papel no desenvolvimento e maturação pós-neonatal do trato gastrointestinal e do sistema imunológico do recém-nascido (Foligne et al. 2001; Jouana

et al., 2006), sendo, também, capaz de modular a atividade funcional de fagócitos da própria secreção (Fagundes et al, 2012).

O cortisol tem sido utilizado terapêuticamente no tratamento de doenças imunológicas, inflamatórias e doenças agudas (Everson et al., 2003; Rady, 2006, Sathasivam, 2008), e que a liberação endógena desse hormônio é capaz de modular, diretamente, as funções imunológicas, desempenhando um papel central, tanto na resposta imunológica inata, quanto na adquirida (Woods et al., 2000; Kohut et al., 2005).

Ensaios *in vitro* revelaram que em baixas concentrações, os glicocorticóides têm um efeito imunoestimulador sobre a atividade de macrófagos, enquanto que, em altas concentrações, tem efeito imunossupressor (Smyth et al., 2004; Lim et al., 2007; Medeiros et al., 2007)).

Assim como o cortisol, o hormônio melatonina foi relatado no colostro (Honorio-França et al., 2013, Hara et al., 2013, Morceli et al, 2013).

A melatonina (MLT) é um neuro-hormônio que exibe diversas funções fisiológicas, incluindo a regulação biológica dos ritmos circadianos: sono, reprodução, imunomodulação (controlando a ativação de células T, B, NK, liberação de citocinas) (Hardeland & Fuhrberg, 1996; Pontes et al., 2006) e ação anti-inflamatória (Hardeland et al., 2006).

A MLT é um neuro-hormônio, uma indoleamina produzida pela glândula pineal, sincronizado por estímulos circadianos claro/escuro por meio do trato retino-hipotalâmico-pineal sintetizada, a partir da serotonina, vinda do aminoácido essencial triptofano (Figura 02). Foi demonstrado que a MLT desempenha um papel fundamental na sincronização dos ritmos do organismo, com ciclos de dia e noite (Arendt, 1998).

A MLT, bem como seus metabólitos, possuem propriedades antioxidantes que inibem o dano induzido por espécies reativas por meio de vários mecanismos. Agem, diretamente, sob os radicais livres e, indiretamente, estimulando a produção/ativando enzimas antioxidantes intracelulares (Tan et al., 2007; Peyrot & Ducrocq, 2008; Hardeland et al., 2009; De Lima et al., 2010).

Esse hormônio tem importante papel imunomodulador no controle de doenças infecciosas (França et al., 2009b), sendo relatado efeito estimulatório sobre macrófagos do colostro humano, na ativação dos mecanismos de defesa celular como o superóxido, fagocitose e liberação de cálcio intracelular (Hara et al, 2013, Honorio-França et al, 2013). Podendo, também, ter atividade pró-oxidativa que pode estar relacionada com a sua conhecida capacidade pró-apoptótica sem células tumorais (Espino et al., 2010).

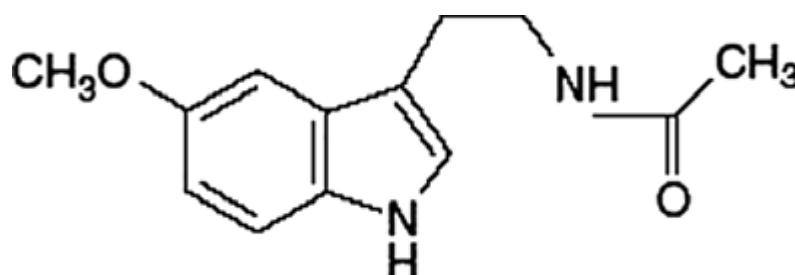


Figura 2 Estrutura química da melatonina. (Akkas et al.,2007).

A melatonina no colostro humano apresenta variação circadiana, sendo que as maiores concentrações foram observadas no período noturno, e sugere-se um perfil fisiológico e auxiliar na defesa do neonato para infecções (França et al., 2009; França et al., 2011a).

No entanto, durante o climatério ocorrem alterações hormonais importantes. O decréscimo dos níveis de hormônios sexuais femininos é consequência natural da menopausa. Essa transição da vida reprodutiva está associada com um incremento nos fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, hiperlipidemia e intolerância a

glicose, gerando, dessa maneira, um aumento da morbidade e mortalidade de origem cardiovascular (Medeiros et al., 2007; Pereira & Siqueira, 2011; Salazar-Molina et al, 2015).

Por outro lado, estudos revelam que o sangue e a glândula mamária são responsáveis pela secreção de hormônios importantes para o desenvolvimento e maturação do trato gastrointestinal e do sistema imunológico de recém-nascidos (Foligne et al, 2001;. Jouana et al., 2006; Trahair et al, 1987). Esses hormônios regulam, temporariamente, a atividade de algumas glândulas endócrinas até que o sistema hormonal do recém-nascido complete o seu desenvolvimento (Bernt & Walker, 1999). Portanto, os hormônios secretados no leite são considerados necessários para a saúde e crescimento de recém-nascidos, bem como, importantes moduladores de funções imunológicas.

No entanto, não foram encontrados dados na literatura que afirmem se as alterações hormonais, ocasionadas pelas mudanças naturais que ocorrem durante o climatério, podem alterar a função de células, bem como, a concentração desses hormônios na secreção.

2. Justificativa

A giardíase é um problema de saúde pública de distribuição mundial considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde. Estima-se que cerca de 200 milhões de infecções ocorrem a cada ano na população mundial, sendo a maioria em crianças (Robertson, *et. al*, 2010, Sadeghi & Borji, 2015). Ao compreender a *G. lamblia* como o parasito de maior prevalência na infância, de distribuição mundial, o impacto da diarreia infantil a longo prazo e a amamentação associada à redução das taxas de diarreia e melhoria do estado nutricional, reforça-se a importância do estudo dos componentes imunológicos do leite em nutrizes climatéricas para *G. lamblia*.

Sabe-se que, tanto a melatonina, como o cortisol, desempenham papel importante de defesa imunológica e são capazes de modular a atividade funcional dos fagócitos do colostro, como os mecanismos de defesa microbiana, além de atrair mais células ao local de infecção, reduzindo a possibilidade de infecções em neonatos.

Vale ressaltar que, na literatura, não foram encontrados dados referentes à atividade de fagócitos do colostro para parasitoses em climatéricas, demonstrando, assim, a pertinência de investigar a atividade funcional dessas células e buscar uma maior compreensão dos efeitos imunoprotetores do colostro para o recém-nascido de mulheres com idade materna avançada.

Deve-se considerar que a composição do leite materno apresenta modificações de acordo com sua cronobiologia. Há diferença em sua composição em relação à hora de sua produção, sua característica anterior e posterior, estágio de maturação (França et al, 2010), doenças maternas (Massmann et al, 2013, França et al, 2013) e a prematuridade do recém-nascido. Questiona-se, se a idade materna avançada e a alteração hormonal,

típica da fase climatérica, apresentariam influência no mecanismo imunológico de proteção para doenças infecto parasitárias e se o colostro de mães climatéricas confere imunidade ao lactente, quanto à infecção por *G. lamblia*.

3. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade funcional de fagócitos do colostro de mulheres climatéricas, modulados por melatonina e cortisol na presença de *Giardia lamblia*

3.1 Objetivos específicos

- Analisar parâmetros imunológicos maternos:
 - Quantificar a concentração dos hormônios cortisol e melatonina;
 - Imunofenotipagem e os percentuais de células CD3⁺, CD4⁺, CD14⁺ e CD15⁺;
 - A atividade funcional dos fagócitos do colostro para *G. lamblia* na presença de hormônios (cortisol e melatonina);
- Avaliar, nas nutrizes as condições de RN:
 - Peso e índice ponderal (relação entre o peso x 100 / comprimento³);
 - Percentual de RN classificados em pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG) para a idade gestacional (relação peso ao nascer / idade gestacional);
 - Apgar no primeiro e quinto minuto de vida.

4. Materiais e Métodos

4.1 Sujeitos e tamanho amostral

Trata-se um estudo prospectivo, tipo corte transversal. Foram coletadas 73 amostras de colostro de nutrizes, usuárias de Serviço Público de Saúde de São Paulo - SP e Barra do Garças - MT. As puérperas foram consultadas sobre a disponibilidade em doar uma amostra de colostro, com volume aproximado de 8ml. A coleta foi realizada por ordenha manual, com técnica adequada, sempre no período da manhã e no intervalo entre duas mamadas, no período correspondente às primeiras 48 a 72 horas após o parto.

4.2 Critérios de inclusão, exclusão e descontinuidade

Para a execução deste estudo foram incluídas nutrizes e seus RN. Nutrizes jovens (idade entre 18 a 35 anos), nutrizes em transição (idade entre 36 a 39 anos) e seus RN e nutrizes climatéricas (idade acima de 40 anos) e seus RN, e, os quais foram classificados, conforme critérios estabelecidos abaixo.

Grupo 1: Nutrizes jovens (grupo controle)

- a) ter idade entre 18 e 35 anos;
- b) idade gestacional no parto a partir de 37 semanas.
- c) ter concebido um recém-nascido vivo e sem malformações.
- d) reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
- e) assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Grupo 2: Nutrizes em transição

- a) ter idade entre 36 a 39 anos
- b) idade gestacional no parto a partir de 37 semanas
- c) ter concebido um recém nascido vivo e sem malformações.
- d) reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
- e) assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Grupo 3: Nutrizes climatéricas

- a) ter idade igual ou superior a 40 anos;
- b) idade gestacional no parto a partir de 37 semanas
- c) ter concebido um recém nascido vivo e sem malformações.
- d) reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
- e) assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critério de exclusão: Idade gestacional no momento do parto inferior ou igual a 37 semanas, mal formação fetal, sorologia positiva para hepatite, HIV e sífilis.

Critério de descontinuidade: Má formação fetal diagnosticada no pós-parto mediato.

4.3 Definição das variáveis

- a) idade – entre 18 e 35, entre 36 e 39 ou, maior o igual a 40 anos;
- b) presença (sim) ou ausência (não) de tabagismo, de hipertensão arterial e de Diabetes *melittus*;
- c) idade gestacional no momento do parto, em semanas completas;
- d) modalidade do parto – Cesária e normal;
- e) peso materno e índice de massa corporal final e inicial

- f) peso ao nascer
- g) estatura ao nascer
- h) apgar no primeiro e quinto minuto de vida

4.3.1 Variáveis Independentes

Grupos experimentais:– nutrízes climatéricas (grupo caso) e nutrízes jovens (grupo controle) e em fase de transição (grupo caso).

4.3.2 Variáveis Dependentes

- a) determinação dos percentuais de células e da concentração de hormônios no colostro;
- b) determinação da ativação do metabolismo oxidativo pelas células do colostro na presença de hormônios;
- c) determinação da fagocitose e atividade microbícida na presença de hormônios;

4.4 Métodos de coleta e avaliação

4.4.1 Obtenção de sobrenadante de colostro humano

Amostras de colostro com volume aproximado de 8ml foram centrifugadas por 10 minutos a 160G sob-refrigeração a 4°C. A centrifugação permite a separação do colostro em três fases nítidas: o "botão" celular, uma porção fluida intermediária e uma camada superior de gordura. A camada superior composta de gordura foi desprezada e o sobrenadante (porção fluida) foi armazenado em freezer –80°C para posterior dosagem de hormônios e as células foram reservadas para posteriores análises.

4.4.2 Dosagem da concentração do cortisol no sobrenadante de colostro

A determinação quantitativa da concentração do hormônio cortisol total no sobrenadante de colostro foi realizada pelo teste imunoenzimático em microplacas - ELISA, pelo Kit Accu Bind (Fagundes et al, 2012). Padrões e amostras (25µl) foram colocadas em microplacas com 96 poços, a seguir adicionado 50 µl de reagente enzimático de cortisol, as placas foram agitadas e adicionados 50µl de anti-cortisol biotina. As placas foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o conteúdo da microplaca foi descartado e, lavada três vezes com tampão de lavagem. A seguir foi adicionado 100µl de substrato e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi interrompida com solução de parada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram obtidos através de curva-padrão e expressos em pg/mL.

4.4.3 Dosagem da concentração de melatonina no sobrenadante de colostro

A determinação quantitativa da concentração do hormônio melatonina no sobrenadante de colostro foi realizada pelo teste imunoenzimático em microplacas de ELISA (Honorio-França et al, 2013). A melatonina presente no colostro foi extraída por cromatografia de afinidade, concentrada em centrífuga à vácuo por 1 minuto a 200g e determinada por kit de ELISA Imuno-Biological Laboratories (IBL, Hamburgo). Os valores da reação foram medidos por absorvância em espectrofotômetro com um filtro de 405nm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram obtidos através de curva-padrão e expressos em pg/ml.

4.4.4 Obtenção de células do colostro

Amostras de colostro com volume aproximado de 8ml foram centrifugadas por 10 minutos a 160G sob-refrigeração a 4°C. As células foram ressuspensas em meio de cultura 199 (Gibco), e separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 160G, sob temperatura de 4°C. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml. As células foram utilizadas nos ensaios de imunofenotipagem, de liberação de ânion superóxido, fagocitose e atividade microbica.

4.4.5 Imunofenotipagem

Células do colostro foram lavadas com Tampão fosfato (PBS) acrescido de BSA (soro albumina bovino) por 10 minutos a 4°C. As células foram marcadas com 5µl de anti-CD4FITC, anti-CD3PE, anti-CD14FITC, anti-CD15PE por 30 minutos. As células foram lavadas e ressuspensas PBS-BSA e a leitura foi feita por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). O mínimo de 10.000 células foi avaliado pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Os dados foram analisados através do software Flowjo 7.2.5.

4.4.6 Tratamento dos fagócitos do colostro com melatonina e cortisol

Os fagócitos do colostro foram tratados pelos hormônios por 1 hora a 37°C sob agitação. Para cada ensaio realizado, como controle dos experimentos, os fagócitos (2×10^6 cels/ml) foram incubados por tempo similar, dependendo do tipo de ensaio, em

meio 199 na ausência de hormônios. A concentração utilizada de hormônio foi de 100 ng/ml, concentração determinada previamente através de curva dose-resposta (França, 2009; Fagundes et al, 2012).

4.4.7 Parasito

Os trofozoítos de *G. lamblia* foram cultivados em Meio Axênico TYI-S-33 modificado, no período entre 2 e 5 dias. Antes dos experimentos, a cultura foi centrifugada a 160 durante 5 min a 4°C. Os trofozoítos foram lavados e ressuspensos em 10ml em meio 199. A seguir os trofozoítos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 4×10^4 trofozoítos/mL.

4.4.8 Viabilidade dos parasitos em meio 199

Antes de cada ensaio capacidade de sobrevivência dos parasitos no meio 199 foi verificada pela incubação de 1×10^6 trofozoítos/ml com 10ml do meio 199 e também com o meio TYI-S-33, a 37°C. Após 2h de incubação, a movimentação do trofozoíto e a mobilidade do flagelo foram avaliadas em microscopia óptica para determinar a viabilidade do parasito. Estes experimentos foram realizados em triplicata e somente deu-se a continuidade aos ensaios diante da constatação da viabilidade do trofozoíto. (Hill e Pearson, 1987).

4.4.9 Dosagem de ânion superóxido

A modulação dos fagócitos do colostro por hormônios foi verificada através da liberação de ânion superóxido, utilizando-se o cromógeno Ferricitocromo C, segundo o

método de Pick & Mizel (1981) e adaptado por Honorio-França et al, 1997. Em presença do ânion superóxido o ferricitocromo C sofre oxidação passando a ferrocitocromo C, sendo esta mudança colorimétrica detectável em espectrofotômetro com filtro de 550nm.

Após a separação as células foram incubadas com *G lamblia*, volumes iguais de parasito e células, em tubos plásticos, durante 30 minutos a 37°C sob agitação para ocorrer a fagocitose. A seguir, a suspensão de células e parasitos foi centrifugada a 160G, o sobrenadante desprezado sendo retirado o excesso de protozoário extracelular. A suspensão de células e parasito foi ressuspendida em 0,5 mL de PBS glicosado contendo ferricitocromo C (concentração de 2mg/mL). Um controle contendo somente células foi realizado paralelamente para verificação da liberação espontânea do ânion superóxido pelas células. As suspensões foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços, com um volume de 100 µl por poço e mantidas em estufa a 37°C durante uma hora. A leitura foi feita em espectrofotômetro para placa com filtro de 550 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação:

$$\text{Concentração O}_2^- \text{ (nmol)} = \text{DO}/6.3 \times 100$$

4.4.10 Avaliação da fagocitose e da atividade microbicida

A fagocitose e a atividade microbicida dos fagócitos do colostro foi avaliada pela técnica alaranjado de acridina descrita por Bellinati-Pires et al. Volumes iguais de suspensão de protozoários (2×10^6 parasitos/mL) e de suspensão de células moduladas ou não por melatonina ou cortisol (2×10^6 células/mL - fagócitos mononucleares e polimorfonucleares) foram misturados. O volume final da mistura fagocitária dependeu

do rendimento celular das amostras de colostro não sendo inferior a 0,5 mL. A suspensão de *G. lamblia* células foi submetida à incubação prévia por 30 minutos, sob agitação a 37°C. Após esse período a fagocitose foi interrompida pela adição de meio de cultura 199 gelado e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 160G sob refrigeração a 4°C. O "pellet" foi corado com 200 µl de alaranjado de acridina (concentração 14,4 mg/ml) por 1 minuto, e a seguir foi ressuspenso em meio 199, centrifugado e lavado mais uma vez.

O índice de fagocitose foi calculado pela contagem do número de células que fagocitaram *G.lambli*a em um total de cem células. Já o índice microbicida foi obtido a partir da contagem de células contendo parasitos. Os parasitos fagocitados com a coloração laranja foram contados como mortos, e parasitos que estavam englobados pelos fagócitos, porém, encontravam-se com a coloração verde, foram considerados vivos (França et al, 2011). Ambos os índices foram realizados em duplicata.

4.5 Aspectos Éticos

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da nutriz, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. O estudo foi conduzido de acordo com as normas do conselho nacional de saúde o qual normatiza pesquisa envolvendo seres humanos. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso – Campus do Araguaia, parecer nº 1.018.281

4.6 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni. As estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0.05 ($P < 0.05$).

5. Resultados

A análise dos dados se dispõe sob a forma de figuras e tabelas, apresentados na sequência abaixo:

5.1 Características antropométricas gestacionais das nutrizes;

5.2 Características antropométricas dos recém-nascidos;

5.3 Concentração de hormônios no sobrenadante de colostro;

5.4 Imunofenotipagem de células do colostro;

5.5 Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN e PMN em presença, ou não, de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios;

5.6 Índice de Fagocitose das células MN e PMN em presença, ou não, de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios;

5.7 Atividade Microbicida dos fagócitos MN e PMN em presença, ou não, de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios.

5.1 Características antropométricas gestacionais das nutrizes

Na Tabela I estão apresentadas as características gerais das nutrizes. Observa-se que a idade média foi de 24.5 anos para as nutrizes jovens. Estas nutrizes tiveram maior percentual de parto cesáreo e menor incidência de hipertensão arterial e Diabetes *Mellitus*. Entre as nutrizes em fase de transição, média de 34.6 anos, nenhuma fazia uso tabaco, entretanto apresentaram maior incidência de hipertensão arterial sistêmica e Diabetes *Mellitus*, todavia foi neste grupo a maior ocorrência de parto normal. A maior incidência de fumantes ocorreu entre as nutrizes climatéricas assim como a concepção por parto cesáreo foi a segunda mais predominante neste grupo, 42 anos em média. Quanto ao ganho de peso durante o processo gestacional, as mulheres do grupo jovem tiveram menor IMC pré e pós gestacional. Todas apresentaram IMC final acima 24,9.

Tabela I: Caracterização antropométrica gestacional das nutrizes em diferentes faixas-etárias.

Nutrizes	18-35 anos	36-39 anos	Mais de 40
	(N=40)	(N=17)	(N=16)
Média da idade (anos)	24.5±5.5	34.6±3.8	42±1.3
Tabagismo (%)	5(2)	-(0)	6.2(1)
Hipertensão Arterial (%)	10(4)	23.5(4)	18.7(3)
Diabetes Mellitus (%)	2.5(1)	34.8(6)	24.8(5)
Parto Cesáreo (%)	90(36)	58.8(10)	86.8(14)
Parto Normal (%)	10(4)	41.2(7)	13.2(2)
Peso Materno Inicial (kg)	65.5±14.6	78.3±17.8	76.4±16.3
Peso Materno Final (kg)	78.7±13	86.4±12.7	87.9±20.1
IMC Inicial	25.6±7.3	30.7±5.8	35.8±11.3
IMC Final	30±6.6	35.2±5.8	39.6±12

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão ou frequência absoluta e relativa de ocorrência.

5.2 Características antropométricas dos recém-nascidos

Na Tabela II estão apresentados os resultados das características antropométricas dos recém-nascidos. Os RN de mães climatéricas tiveram maior peso ao nascimento e menor idade gestacional. Os RN de puéperas em idade de transição tiveram maior estatura ao nascimento. A idade gestacional, na ocasião do parto, foi maior no grupo das nutrizes jovens.

Tabela II Caracterização antropométrica dos recém-nascidos de nutrizes em diferentes faixas-etárias.

RN de Nutrizes	18-35 anos (N=40)	36-39 anos (N=17)	Mais de 40 (N=16)
Peso ao nascer (g)	3283±487.1	3386±395.2	3453±486.6
Estatura (cm)	47.9±1.8	49±1.6	48.5±1.9
Índice Ponderal	2.9±0.4	2.9±0.2	3±0.2
Idade Gestacional (semanas)	38.6±1.3	38.1±1.3	37.7±2.2

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

Na Tabela III está descrita a classificação do RN de acordo com seu peso ao nascer (g) e idade gestacional (IG). Identificou-se que a maioria dos RN, independentemente da idade materna, foi classificado como adequados para a idade gestacional (AIG). Houve apenas a ocorrência de pequeno para a idade gestacional (PIG), no grupo das nutrizes jovens, a classificações de grande para a idade gestacional (GIG), teve maior frequência relativa no grupo das nutrizes climatéricas.

Tabela III: Classificação do RN quanto à adequação de seu tamanho à idade gestacional de nutrizes em diferentes faixas-etárias.

	18-35 anos	36-39 anos	Mais de 40
Classificação do RN	(N=40)	(N=17)	(N=16)
Peso ao nascer (g) X pela Idade Gestacional (semanas)	N(%)	N(%)	N(%)
Pequeno para a Idade Gestacional	5.0(2)	0.0(0)	0.0 (0)
Adequado para a Idade Gestacional	85(34)	94.1(16)	81.2 (13)
Grande para a Idade Gestacional	10(4)	5.8(1)	18.8 (3)

Os resultados estão apresentados conforme a frequência relativa e absoluta.

Na Tabela IV, está descrita a avaliação do recém-nascido quanto ao grau de tolerância ao processo de parturição e o grau de adaptação à vida extrauterina. No grupo das nutrizes climatéricas houve maior frequência de RN com dificuldade leve e em grau moderado à tolerância e à adaptação da vida extrauterina. Não houve ocorrência de grau de dificuldade de ordem grave.

Tabela IV: Classificação do RN quanto ao Apgar no primeiro e quinto minuto de vida por faixa etária materna.

APGAR	18-35 anos (N=34)	36-39 anos (N=14)	Mais de 40 (N=12)
Ótimas condições	90(32)	70.6(12)	50(8)
Dificuldade leve	5(2)	11.7(2)	25(4)
Dificuldade em grau moderado	5(2)	17.6(3)	25(4)
Dificuldade de ordem grave	0	0	0

Os resultados estão apresentados conforme a frequência relativa e absoluta.

5.3 Concentração de hormônios no sobrenadante de colostro

Na Figura 3 estão apresentadas as concentrações de cortisol no sobrenadante de colostro de mães em diferentes faixas etárias. Observa-se que houve aumento da concentração de cortisol presente no sobrenadante de colostro de mães climatéricas comparados a concentração do hormônio no sobrenadante de colostro de mães jovens. Não houve diferença significativa entre as concentrações de cortisol no sobrenadante de colostro de nutrizes jovens e em fase transição.

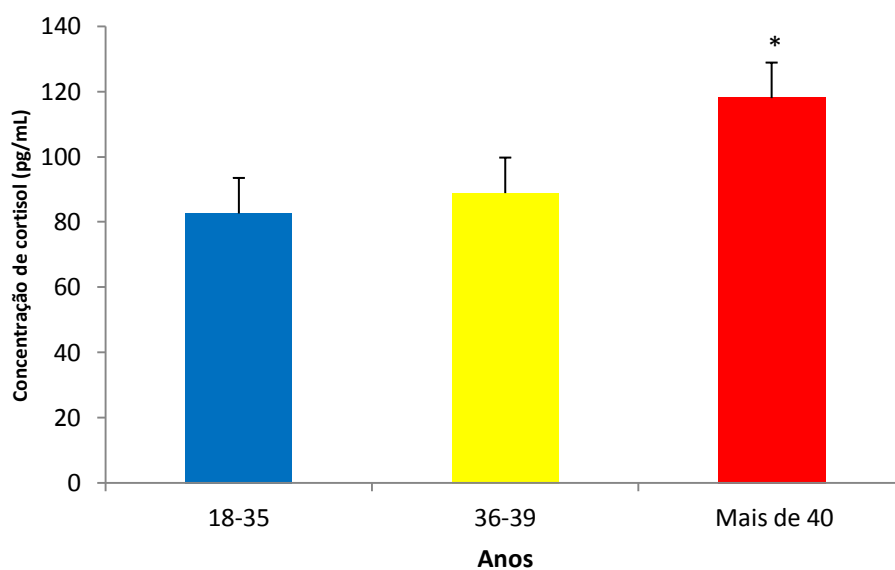


Figura 3: Concentração de cortisol (pg/mL) em colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias. Média e erro padrão de cinco nutrizes diferentes nos grupos de faixa-etária de 18-35 e 36-39 e nove nutrizes no grupo com idade maior que 40. $P < 0.05$.

Na Figura 3 estão apresentadas as concentrações de melatonina no sobrenadante de colostro de mães em diferentes faixas etárias. Observa-se que houve aumento de melatonina no sobrenadante de colostro de mães climatéricas quando comparado às concentrações do hormônio presentes em colostro mães jovens ou em fase de transição.

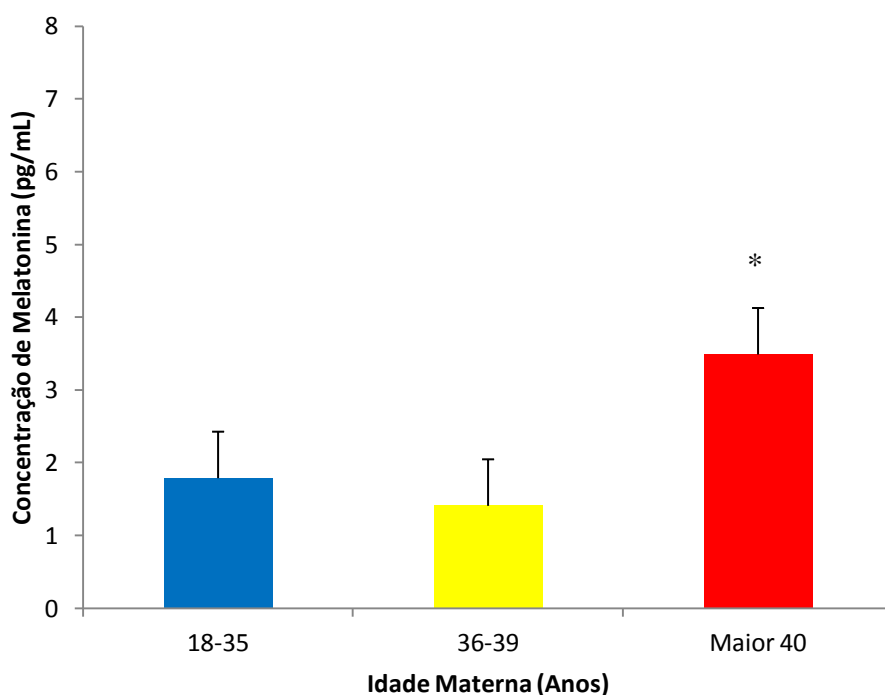


Figura 4: Concentração de melatonina (pg/mL) em colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias. Média e erro padrão de cinco nutrizes diferentes em cada grupo. $P < 0.05$

5.4 Imunofenotipagem de células do colostro

As médias e os percentuais das subpopulações de células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD14^+$ e $CD15^+$ estão apresentados na Tabela V. Observa-se que colostro, independente da faixa-etária materna, apresenta maior percentual de células $CD3^+$ e $CD15^+$. A análise entre os grupos revelou que no colostro de mães climatéricas houve redução de células expressando $CD14^+$ e $CD15^+$ quando da comparação com os demais grupos experimentais (Tabela IV).

Tabela V: Imunofenotipagem de células do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias.

Marcadores	Percentual celular (%)			
	Faixas etárias	18 a 35 anos	36 e 39 anos	Mais de 40 anos
CD 3+	Colostro	17.4±4.7	20.29±6.26	19.3±5.4
CD 4+	Colostro	8.85±3.75 [#]	10.37±4.39 [#]	9.83 ±3.77 [#]
CD 14+	Colostro	9.83±4.02 [#]	10.72 ±4.37 [#]	7.47±1.72* [#]
CD 15+	Colostro	16.20±3.60	19.75 ±6.51	12.94±5.07* [#]

Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimentos com células de nutrizes em diferentes faixas etárias, onze (18-35), dez (36-39) e nove (mais de 40 anos). *p<0.05 diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, considerando o mesmo marcador; [#]p<0.05 diferenças estatísticas entre os marcadores, considerando o mesmo grupo experimental.

5.5 Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN e PMN em presença, ou não, de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios.

A liberação do ânion superóxido pelos fagócitos mononucleares (MN) do colostro tratados pela melatonina e cortisol está apresentada na Tabela VI. Quando as células MN foram tratadas pelos hormônios observa-se que a melatonina foi capaz de estimular a liberação de superóxido nos grupos nutrizes em fase de transição e no grupo das climatéricas.

A liberação do ânion superóxido pelos fagócitos PMN do colostro tratados pela melatonina e cortisol está apresentada na

Tabela VII. O hormônio melatonina aumentou a liberação de superóxido pelos fagócitos PMN dos grupos de nutrizas em fase de transição e climatéricas.

Tabela VI: Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol).

Nutrizas	18-35	36-39	Maior de 40
	anos	anos	
Fagócitos MN incubados com	Superóxido (nmols)		
Espontâneo	1.62±0.6	1.35±0.4	1.52±0.5
Melatonina	2.05±0.4	2.40±0.2*	2.37±0.4*
Cortisol	1.61±0.4	1.70±0.3	2.00±0.1

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. * p<0.05 diferenças estatísticas entre os fagócitos (MN) controle (não tratados) e os tratados pelos hormônios.

Tabela VII: Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos PMN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol).

Puérperas	18-35	36-39	Maior de 40
	anos	anos	
Fagócitos PMN incubados com	Superóxido (nmols)		
Espontâneo	1.72±0.4	1.50±0.5	1.60±0.5
Melatonina	2.16±0.7	2.52±0.7*	2.45±0.6*
Cortisol	1.60±0.3	1.62±0.5	1.85±0.2

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. * p<0.05 diferenças estatísticas entre os fagócitos controle (não tratados) e os tratados pelos hormônios

Tabela VIII: Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias em presença ou não de *G. lamblia*, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol).

Puérperas	18-35	36-39	Mais de 40
	anos	anos	
Fagócitos MN incubados com	Superóxido (nmols)		
Espontâneo	1.62±0.6	1.35±0.4	1.52±0.5
<i>G. lamblia</i>	1.64±0.19	1.95±0.49	2.01±1.20
Melatonina	1.67±0.34	1.90±0.60	2.03±0.41
Cortisol	4.17±0.72*	3.13±0.65*	3.31±0.15*#

Liberação do ânion superóxido pelos fagócitos mononucleares (MN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias, tratados ou não pelos hormônios melatonina e cortisol na presença de *G. Lamblia*. * P<0,05 diferenças estatísticas entre os tratamentos, considerando o mesmo grupo; # P<0,05 diferenças estatísticas entre os grupos, considerando o mesmo tipo de tratamento.

Não houve diferenças na liberação de superóxido pelos fagócitos MN do colostro quando na presença de *G. lamblia* comparado à liberação espontânea. Quando as células MN foram tratadas pelos hormônios observa-se que o cortisol foi capaz de estimular a liberação de superóxido em todos os grupos estudados. As maiores concentrações de ânion superóxido foram observadas no grupo de mulheres jovens. Os fagócitos tratados pela melatonina na presença de *G. lamblia* apresentaram liberação de superóxido similares aos fagócitos incubados somente com o parasito.

Os resultados da liberação de superóxido pelos fagócitos PMN do colostro de nutrizes em diferentes faixas-etárias estão na tabela IX. Quando os fagócitos foram incubados com a *G. Lamblia* observa-se que houve aumento na concentração do ânion pelas células PMN do colostro de mães climatéricas quando da comparação da liberação espontânea. Não houve diferenças entre os grupos estudados na liberação de superóxido quando as células foram tratadas pela melatonina. Quando as células PMN foram tratadas pelo cortisol se observa aumento na liberação de superóxido em todos os grupos estudados. Na comparação entre os grupos estudados os resultados mostram que houve menor liberação de superóxido pelos fagócitos do colostro de mães em fase de transição e climatéricas.

Tabela IX: Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos PMN do colostro de mães de diferentes faixas-etárias em presença ou não de *G. lamblia*, tratados ou não, por hormônios (Melatonina e Cortisol).

Puérperas	18-35	36-39	Mais de 40
	anos	anos	
Fagócitos PMN incubados com	Superóxido (nmols)		
Espontâneo	1.72±0.4	1.50±0.5	1.60±0.5
<i>G. lamblia</i>	2.37±0.38	1.81±0.19	2.73±0.69 [#]
Melatonina	1.96±0.22	1.48±0.83	2.05±0.52
Cortisol	4.05±0.69 [*]	3.07±0.38 [*]	3.17±0.45 [*]

Liberação do ânion superóxido pelos fagócitos polimorfonucleares (PMN) do colostro de nutrízes em diferentes faixas-etárias tratados ou não pelos hormônios melatonina e cortisol na presença de *G. lamblia*. * P<0,05diferenças estatísticas entre os tratamentos e a liberação espontânea, considerando o mesmo grupo; # P<0,05 diferenças estatísticas entre os grupos, considerando o mesmo tipo de tratamento.

5.6 Índice de Fagocitose das células MN e PMN em presença, ou não, de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios.

Na Figura 5 estão apresentados os resultados do índice de fagocitose das células MN do colostro de nutrízes em diferentes faixas-etárias, tratadas ou não com hormônios.

Os índices de fagocitose de células MN do colostro tratados pelo hormônio melatonina dos grupos de mães climatéricas foram maiores quando comparado aos índices observados quando as células MN não tratadas. Quando se avaliou o índice de fagocitose entre os grupos se observou aumento de fagocitose pelas células MN do colostro do grupo das nutrizes em fase de transição ($P < 0,05$), quando comparado às células MN dos grupos de nutrizes climatéricas e jovens. O índice de fagocitose das células MN do colostro de mulheres do grupo nutrizes climatéricas quando incubados com *G. lamblia* e tratados por melatonina foi maior em comparação às nutrizes jovens e similares aos índices observados em células do grupo de nutrizes em fase de transição (Figura 5).

Na Figura 6 estão apresentados os resultados do índice de fagocitose das células PMN do colostro de nutrizes em diferentes faixas-etárias, tratadas ou não com hormônios.

Nos grupos estudados, quando se avaliou o índice de fagocitose entre os grupos com o mesmo tratamento, se observou que houve aumento de fagocitose pelas células PMN do colostro do grupo das nutrizes em fase de transição ($P < 0,05$), quando comparado às células MN dos grupos de nutrizes climatéricas e jovens. O índice de fagocitose das células PMN do colostro de mulheres do grupo nutrizes climatéricas quando tratados pelo cortisol e incubados com *G. lamblia* foi maior em comparação às nutrizes jovens e, às em fase de transição (Figura 6).

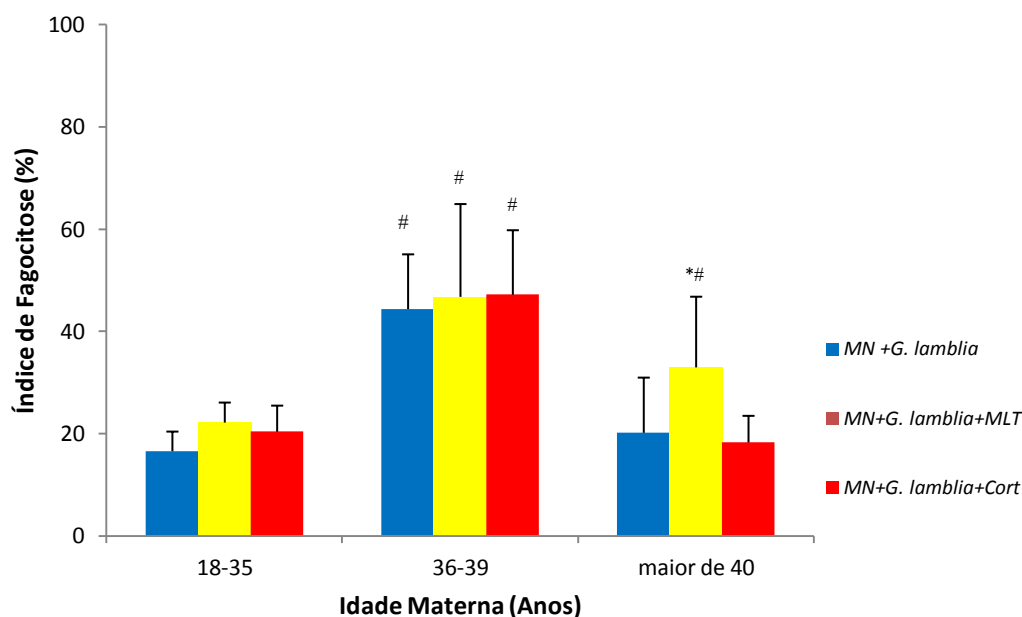


Figura 5: Índice de Fagocitose de células mononucleares (MN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratadas ou não pelos hormônios melatonina (MLT) e cortisol (Cort.) na presença de *G. lamblia*. * $P < 0.05$ diferenças estatística entre os tratamentos, c considerando o mesmo grupo; # $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre os grupo, considerando o mesmo tipo de tratamento.

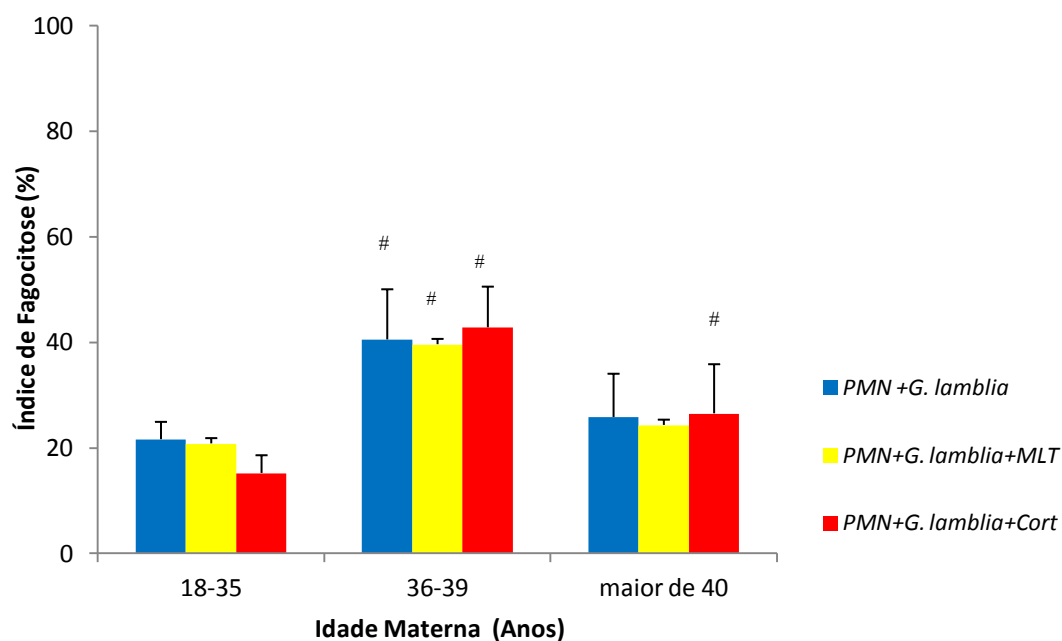


Figura 6: Fagocitose por células polimorfonucleares (PMN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratadas ou não pelos hormônios melatonina (MLT) e cortisol (Cort) na presença de *G. lamblia*. # $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os grupos, considerando o mesmo tipo de tratamento.

5.7 Atividade Microbicida dos fagócitos MN e PMN em presença, ou não, de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios.

Figura 7 apresenta a atividade microbicida dos fagócitos MN em presença de *G. lamblia*, tratados ou não, pelos hormônios. A atividade microbicida dos fagócitos do colostro de mães jovens aumentou quando as células foram tratadas pelos hormônios. No grupo em transição observa-se que quando os fagócitos foram tratados pelo cortisol houve redução na atividade microbicida. O tratamento dos fagócitos com a melatonina reduziu os índices microbicidas dos fagócitos de mães climatéricas.

Quando se avaliou entre os grupos observa-se que houve aumento no índice microbicida de fagócitos não tratados pelos hormônios de nutrízes em fase de transição e climatérica. O tratamento dos fagócitos pelo hormônio cortisol reduziu o índice microbicida dos fagócitos de mães do grupo de transição, enquanto que no grupo de mães climatéricas observa-se redução nos índices microbicidas por parte dos fagócitos do colostro tratados pela melatonina. Os fagócitos do colostro de mães climatéricas apresentaram aumento na atividade microbicida para *G. lamblia* quando tratados pelo cortisol quando comparados ao grupo de transição (Figura 7).

Figura 8 apresenta a atividade microbicida dos fagócitos PMN em presença de *G. lamblia* tratados, ou não, por hormônios. No grupo das nutrízes jovens observa-se que o tratamento dos fagócitos PMN pelos hormônios aumentou a atividade microbicida quando comparado aos fagócitos não tratados. Na comparação entre os grupos, observa-se que os índices microbicidas dos fagócitos PMN não tratados pelos hormônios foram maiores nos grupos das nutrízes em transição e climatéricas.

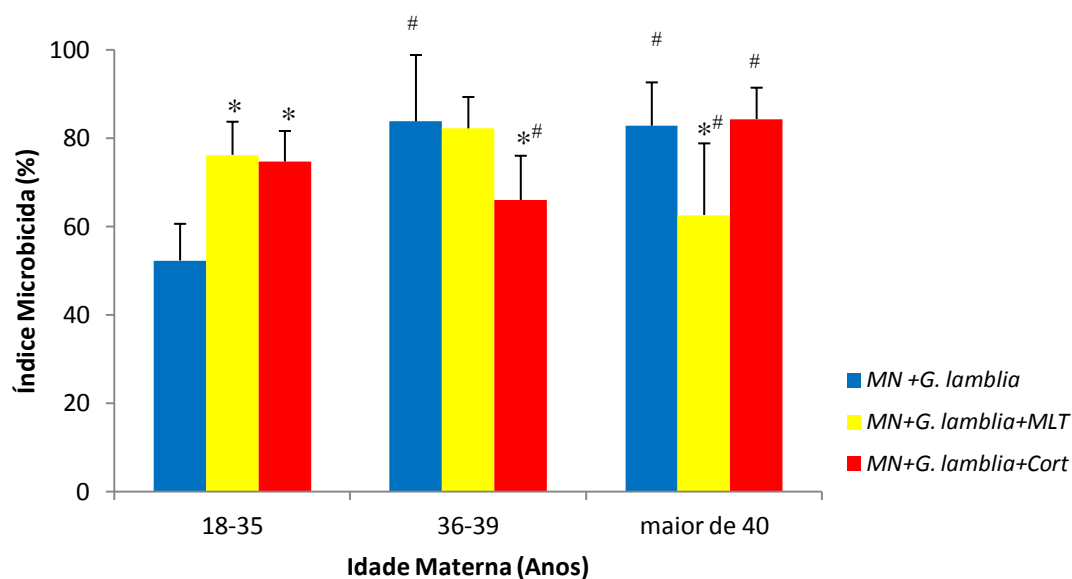


Figura 7: Atividade microbicida pelos fagócitos mononucleares (MN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratados ou não pelos hormônios melatonina e cortisol na presença de *G. lamblia*. * $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os tratamentos, considerando o mesmo grupo; # $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os grupos, considerando o mesmo tipo de tratamento.

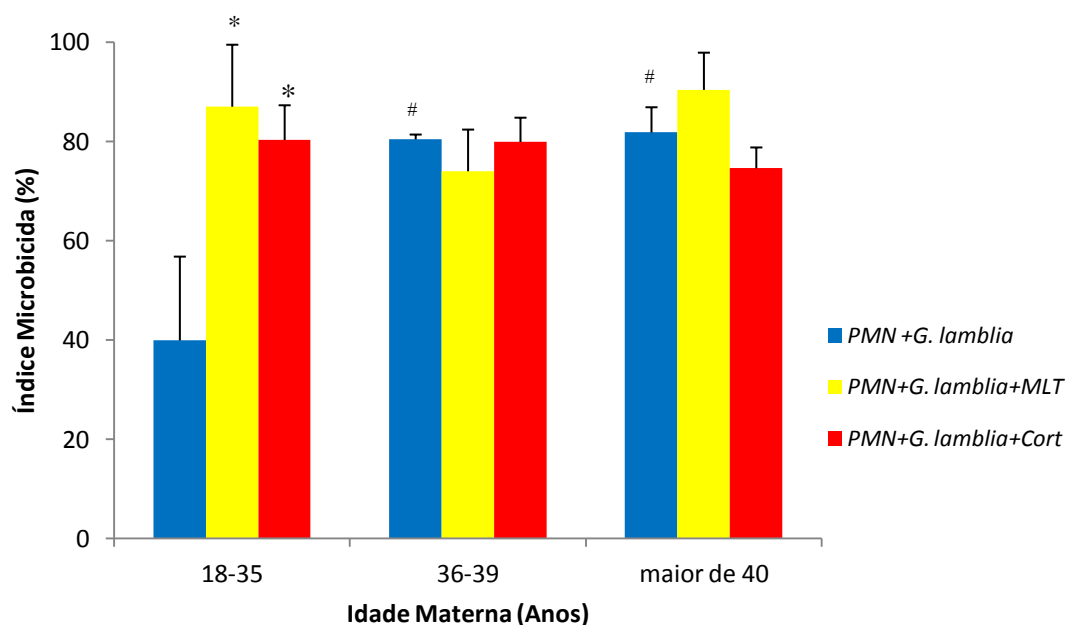


Figura 8: Atividade microbicida pelos fagócitos polimofonucleares (PMN) do colostro de nutrizes em diferentes faixas etárias tratados ou não pelos hormônios melatonina e cortisol na presença de *G. lamblia*. * $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os tratamentos, considerando o mesmo o mesmo grupo; # $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os grupos, considerando o mesmo tipo de tratamento.

6. Discussão

Os efeitos gestacionais adversos na gestação em idade avançada incluem recém-nascidos (RN) com baixa vitalidade, menor peso ao nascerem, prematuros e pequenos para idade gestacional e maiores índices de infecções (Azevedo, et al., 2002; Andrade et al., 2004; Cleary-Goldman, 2005; Delpisheh et al, 2008; Benzies, 2008).

A literatura relata que recém-nascidos de climatéricas são mais propensos a necessitar de cuidados intensivos (Cohen, 2014; Vaughan et al., Cleary & Murphy; 2014; Klemetti et al. 2014), portanto neste período o aleitamento materno é considerado fundamental.

Neste estudo, notou-se que nos RN de mães climatéricas tiveram maior frequência de dificuldade leve e em grau moderado à tolerância e à adaptação da vida extrauterina. Também, apresentaram maior peso ao nascimento e menor índice ponderal, apesar de terem menor idade gestacional na ocasião do parto, uma vez que, de acordo com a OMS (1980), prematuros nascem com menos de 37 semanas de idade gestacional. Todavia, as classificações de grande para a idade gestacional (GIG), teve maior prevalência no grupo das nutrizes climatéricas, enquanto que não houve ocorrência de recém-nascido pequeno para a idade gestacional (PIG). Esses achados divergem da literatura quanto à taxa de prematuridade, o baixo peso ao nascer, a restrição de crescimento fetal e as comorbidades associadas à idade serem mais altas entre as gestantes com mais de 40 anos (Andrade et al., 2004; Cleary-Goldman, 2005; Benzies, 2008; Cohen 2014). Os achados perinatais deste trabalho, provavelmente, se devem ao bom acompanhamento materno durante o pré-natal.

O Diabetes *Mellitus* e a Hipertensão Arterial Sistêmica foram mais frequentes no grupo das nutrizes em idade de transição do que no grupo das nutrizes climatéricas e menor em nutrizes jovens. Contestando os achados de Cohen (2014), de que, embora saudáveis, as gestantes climatéricas têm gestações com maior risco, em comparação com mulheres mais jovens, devido às comorbidades associadas à idade.

No que se refere ao ganho de peso durante o processo gestacional, as mulheres do grupo jovem tiveram menor IMC pré e pós-gestacional. Todas nutrizes estudadas, independentemente da faixa etária, apresentaram IMC final acima do preconizado pela OMS (1998), que é de 18,5 a 24,9. Cerca de 2/3 das mulheres ganham mais peso que o recomendado (Melo 2011).

A despeito dos resultados perinatais observados, a idade materna avançada não resultou em quadros obstétricos complicados, tendo em vista os maiores percentuais de partos cesáreos, observados entre as nutrizes jovens, de incidência de hipertensão arterial sistêmica e diabetes *mellitus*, entre as nutrizes em fase de transição.

Sabe-se que o climatério é um período de vida das mulheres, caracterizado por diminuição de hormônios, principalmente os sexuais (Medeiros et al., 2007; Pereira & Siqueira, 2011; Salazar-Molina et al, 2015). Por outro lado, o sangue e a glândula mamária são responsáveis pela secreção de hormônios importantes para o desenvolvimento e maturação do trato gastrointestinal e do sistema imunológico de recém-nascidos (Trahair et al.,1987, Foligne et al, 2001; Sauter et al, 2004; Jouana et al., 2006; Ziegler, 2011.). Esses hormônios regulam, temporariamente, a atividade de algumas glândulas endócrinas até que o sistema hormonal do recém-nascido complete o seu desenvolvimento (Bernt & Walker, 1999).

Neste trabalho se verificou que ocorrem alterações na concentração de melatonina e cortisol no colostro de mães climatéricas e que estes hormônios são capazes de modular a atividade funcional de fagócitos da própria secreção durante interações com *G. lamblia*.

A literatura reporta à importância de hormônios como potentes imunomoduladores, que participam de vários aspectos relacionados ao sistema imunológico (Kuhlwein et al., 2001; Corrêa et al, 2006). Neste trabalho, a concentração tanto de melatonina como de cortisol foi mais elevada em colostro de mulheres climatéricas.

O colostro é conhecido por ser uma secreção com componentes imunológicas ativos, que atuam no intestino do RN (Bernet e Walker, 2009). A presença de níveis de cortisol e melatonina similares aos observados no soro humano (Watts, 1988, Fagundes et al., 2012; Honorio-França et al, 2013; Hara et al., 2013, Morceli et al, 2013), parecem ser necessários para a saúde e crescimento de recém-nascidos, bem como, importantes moduladores de repostas imunológicas.

O cortisol, durante o período gestacional, tem sido relatado atuar na implantação bem sucedida do embrião, bem como para o subsequente crescimento e desenvolvimento do feto e da placenta (Michael & Papageorghiou, 2008). No período puerperal, o cortisol, tem importante papel no desenvolvimento e maturação pós-neonatal do trato gastrointestinal e do sistema imunológico do recém-nascido (Foligne et al. 2001; Jouana et al., 2006). É um hormônio importante no processo inflamatório (Fagundes et al. 2012). Também desempenha papel significativo na resposta imunitária (Mommsen et al, 1999; Fagundes et al. 2012).

A melatonina têm sido bastante estudada quanto as suas funções no organismo (Nelson & Demas, 1997; Maestroni, 2002; Pandi-Perumal et al., 2008; Hara et al, 2013, Honório-França et al, 2013). As ações benéficas da melatonina estão associadas à capacidade de retirar radicais livres e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Klepac et al., 2005; Sudnikovich et al., 2007; Pandi-perumal et al., 2008). Além disso, a melatonina apresenta efeitos imunomoduladores (Besedovsky & Del Rey, 1996, Honório-França et AL, 2013, Hara et a, 2013) e estimula as células do sistema imunológico (Cutolo et al., 1999; Skwarlo-Sonta, 2002). No colostro este hormônio apresenta variação circadiana, sendo que as maiores concentrações são observadas no período noturno, e sugere-se um perfil fisiológico e auxiliar na defesa do neonato para infecções (França et al., 2009; França et al., 2011a).

Por outro lado, o leite materno, de acordo com as necessidades da criança, possui a capacidade de modificar na sua composição, tanto do ponto de vista de nutrientes, quanto de fatores bioativos (Balaban, Silva 2004; França, et al. 2010; Honório-França, França 2011 Ballard & Morrow 2013). Neste estudo, a presença de maior concentração de hormônios no colostro de mães climatéricas e de recém-nascidos, com maior percentual de alterações perinatais, sugere esta adequação no colostro destas nutrizes, uma vez que gestações em idade avançada, associam-se a prejuízos relativos aos efeitos perinatais adversos. Entre eles prematuridade, alterações no peso ao nascer e maiores índices de infecções (Gravena et al. 2012; Darney et al. 2013).

Diversos estudos revelam que células imunocompetentes quando ativadas, podem sintetizar melatonina localmente, atuando de forma parácrina e autócrina

(Garcia-Mauriño et al., 1997; Skwarlo-Sonta et al., 2003; Pontes et al., 2006; Markus et al., 2007; Markus, 2010; Beirigo, 2011). Além disso, a melatonina pode estimular produção de citocinas em células mononucleares do sangue de humanos (Garcia-Mauriño et al., 1997), aumentar a proliferação de linfócitos T, a apresentação de antígenos e a atividade fagocitária (Pontes et al., 2006, Tamura et al., 2009). Neste estudo, além de alterações nas concentrações de melatonina no colostro de mães climatéricas, houve alterações no percentual de células imunocompetentes.

O papel da melatonina sobre a expressão de tipos celulares ainda não está totalmente elucidado. Este hormônio parece exercer efeito antiinflamatório, interferindo na migração celular inibindo o rolamento e adesão de células imunocompetentes (Lotufo et al., 2001; Beirigo, 2011). Assim, seu efeito sobre o sistema imune é dependente do local de produção e quantidade produzida, e não pode ser caracterizado apenas como pró ou anti-inflamatório.

Por outro lado, a imunidade passiva é determinada pelo nível de imunidade sistêmica da mãe e pela quantidade de colostro ingerida pelo neonato (Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991; Salmon, 1999; Rogers, 2001). Sabe-se que, em doenças crônicas, os percentuais de células imunocompetentes maternas apresentam-se reduzidos e repercutem na imunidade do recém-nascido (Fagundes, 2015). Neste estudo identificamos que, na gestação em idade avançada, as nutrizes climatéricas, apresentam colostro com diminuição de fagócitos expressando CD14⁺ e CD15⁺.

A imunidade celular é importante para a defesa do organismo durante infecção por *G.lambli*a, principalmente macrófagos e neutrófilos (França-Botelho et al, 2006). Na literatura há a descrição da importância imunomoduladora dos hormônios, do

mecanismo de interação entre células e hormônios na resposta imune (Dardenne et al., 1994; Kuhlwein et al., 2001; Long et al., 2005; Corrêa et al, 2006; Lim et al., 2007; França et al. 2011; Fagundes et al. 2012; Hara et al, 2013, Honorio-França et al, 2013). O cortisol e melatonina são capazes de modular a atividade funcional de fagócitos do colostro (Fagundes et al, 2012; Hara et al, 2013).

Os fagócitos do colostro apresentam duas populações celulares que diferem quanto à atividade funcional. Os fagócitos MN apresentam atividade microbicida para certas bactérias quando estimulados, enquanto que os fagócitos PMN apresentam menor capacidade microbicida (Honorio-França et al, 1997; Honorio-França et al, 2001). Neste trabalho, observou-se que a melatonina aumentou a liberação de superóxido tanto de fagócitos MN como PMN do colostro de mães em fase de transição e climatéricas. Quando na presença do parasito, houve redução da liberação deste ânion por parte destes fagócitos tratados por melatonina, sugerindo que o parasito modificou a ação deste hormônio sobre os fagócitos do colostro.

Por outro lado, os fagócitos, previamente tratado pelo cortisol, quando na presença do parasito, independente da faixa-etária, aumentaram a liberação de superóxido. De acordo com a literatura, a geração de radicais livres tem sido considerada um importante mecanismo de proteção durante processos infecciosos, principalmente em infecções intestinais (Rodriguez et al., 2004; França et al., 2011a; França et al., 2011b).

Há relatos que o hormônio cortisol tem sido utilizado terapêuticamente, no tratamento de doenças imunológicas, inflamatórias e doenças agudas (Rady, 2006), e que a liberação endógena deste hormônio é capaz modular, diretamente, as funções

imunológicas, desempenhando um papel central, tanto na resposta imunológica inata, quanto na resposta adquirida (Woods et al., 2000; Kohut et al., 2005). Ensaios *in vitro* revelaram que em baixas concentrações, os glicocorticóides têm um efeito imunoestimulador sobre a atividade de macrófagos, enquanto que em altas concentrações tem efeito imunossupressor (Lim et al., 2007; Smyth et al., 2004; Long et al., 2005, Fagundes et al, 2012).

Fagócitos mononucleares desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Eles produzem NADPH oxidase, durante o processo de fagocitose, que induz a formação do superóxido e de outros metabólitos ativos do oxigênio, que são importantes na eliminação de micro-organismos e cruciais para o sucesso das respostas imunes e reações inflamatórias (Babior, 1984).

Componentes solúveis presentes no colostro, como os hormônios, interagem com as células. Aumento da liberação de superóxido tem sido associado ao aumento da atividade fagocítica e microbicida (Honorio-França et al., 2001; França et al., 2011b).

Neste trabalho, o hormônio aumentou a fagocitose de *G. lamblia* pelos fagócitos MN de mães climatéricas. No entanto, os maiores índices de fagocitose foram observados em fagócitos MN e PMN de mães em idade de transição.

Fagocitose e atividade microbicida, com participação de metabólitos ativos de oxigênio, incluindo radicais livres, tanto pelos fagócitos do colostro humano, como do sangue têm sido considerados como um importante mecanismo de defesa para infecções por protozoários (França-Botelho et al., 2010).

Apesar da melatonina aumentar a fagocitose do parasito por fagócitos de mães climatéricas, baixos níveis microbicidas foram observados. Cabe ressaltar que este hormônio foi capaz de estimular a atividade microbicida de fagócitos para *G. lamblia* do grupo de mães jovens.

A literatura reporta que fagócitos MN do colostro, de mães saudáveis e de idade reprodutiva abaixo de 35 anos, estimulados por melatonina apresentam atividade microbicida para uma variedade de microrganismos, enquanto que, fagócitos de mães com doenças crônicas, estimulados por este hormônio, apresentam baixos índices microbicidas (Morceli et al, 2013). A insuficiente estimulação da atividade funcional de fagócitos de mães climatéricas pela melatonina pode ser devido a falta de efeitos pro-oxidativos, sugerindo que o colostro produzido por nutrizas com gestações de idade avançada, além de apresentar alterações hormonais possui células com capacidade de resposta diferenciada a agentes imunomoduladores durante interações parasito-hospedeiro.

Esta menor atividade microbicida destas células, quando estimuladas por melatonina, provavelmente, possa estar minimizando os possíveis efeitos deletérios que podem ser gerados durante o processo de ativação celular, uma vez que é característica dos componentes imunológicos do colostro agir sem, no entanto, causar processos inflamatórios.

Por outro lado, a atividade microbicida para *G. lamblia* dos fagócitos PMN de mães jovens foram estimulados por ambos os hormônios. Altos índices microbicidas para o parasito foram observados em fagócitos PMN de mães do grupo de transição e

climatéricas, sugerindo que estas células estão ativadas, independente de estimulação hormonal exógena.

É importante salientar que as diferenças encontradas durante a interação parasito-célula, em mães climatéricas pode ser devido à fase de alterações hormonais da secreção. Chama à atenção as alterações encontradas em mães em fase de transição, uma vez que, no colostro, ainda não são observadas alterações hormonais, mas modificações nas respostas celulares, frente à *G. lamblia*. Essas modificações devem ser consideradas, pois a transferência passiva de componentes imunológicos, através do colostro é de fundamental importância para o recém-nascido, em especial os que apresentam infecções pelo parasito.

Sabe-se que, devido à imaturidade da função digestiva do neonato, as células recebidas através do colostro não são destruídas pelas enzimas digestivas, bem como outros fatores presentes e, provavelmente, permanecem íntegros nas porções superiores do intestino, podendo, desta maneira, interagir entre si, e atuar na proteção da mucosa. Alguns estudos têm sugerido que as células do colostro permanecem viáveis na mucosa intestinal por um período de 4 horas (Hugaes et al., 1988; Caspari, 1993) e podendo, assim exercer as atividades microbidas e de produção de anticorpos no recém-nascido (Xanthou, 1994).

A atividade funcional dos fagócitos do colostro pelos hormônios cortisol e melatonina, em nutrizes com gestação de idade avançada, pode representar um mecanismo adicional de suma importância para a proteção e tratamento de infecções por parasitos para a criança. Essas interações, além de proteger a criança de infecções,

podem, ainda, exercer influência no processo de colonização e desenvolvimento do trato gastrointestinal do recém-nascido.

7. Conclusões

- Os recém-nascidos de mães climatéricas apresentaram maior prevalência de dificuldade leve e, em grau moderado, à tolerância e à adaptação da vida extrauterina;
- O colostro de mães climatéricas apresenta maior concentração de melatonina e cortisol;
- Houve aumento percentual de células no colostro, expressando CD3⁺ e CD15⁺, independente da faixa-etária materna;
- No colostro de mães climatéricas, observou-se redução do percentual de células, expressando marcadores CD14⁺ e CD15⁺;
- A melatonina aumentou a liberação de superóxido, tanto de fagócitos MN, como PMN do colostro de mães, em fase de transição e climatéricas;
- Na presença de *G. lamblia*, houve menor liberação do ânion pelos fagócitos MN e PMN tratados por melatonina, sugerindo que o parasito modifica a ação desse hormônio sobre os fagócitos do colostro;
- Houve aumento da liberação de superóxido nos fagócitos tratados com cortisol na presença de *G.lamblia*;
- Os hormônios cortisol e melatonina exerceram efeitos imunomoduladores sobre a fagocitose de *G. lamblia* pelos fagócitos MN de mães climatéricas, uma vez que foram observados aumento dos índices fagocíticos, por parte destas células. No entanto, os maiores índices de fagocitose foram observados em fagócitos MN e PMN de mães em idade de transição;

- Embora a melatonina tenha aumentado a fagocitose do parasito pelas células do colostro de mães climatéricas, baixos níveis microbicidas foram observados, sugerindo que a insuficiente estimulação da atividade microbicida de fagócitos de mães climatéricas pela melatonina possa ser devido à falta de efeitos pró-oxidativos, e que o colostro produzido pelas nutrizes com gestações de idade avançada, além de apresentar alterações hormonais, possui células com capacidade de resposta diferenciada a agentes imunomoduladores, durante interações parasito-hospedeiro;
- Altos índices microbicidas para o parasito foram observados em fagócitos PMN de mães do grupo de transição e climatéricas, sugerindo que essas células estão ativadas, independente de estimulação hormonal exógena;
- Esses dados sugerem que as diferenças encontradas durante a interação parasito-célula, em mães climatéricas, pode ser devido à fase de alterações hormonais, tanto maternas, como da própria secreção;
- A atividade funcional dos fagócitos do colostro, modulados pelos hormônios cortisol e melatonina, para *G. lamblia* de nutrizes com gestação de idade avançada, pode representar um mecanismo adicional de suma importância para a proteção e tratamento de infecções por parasitos para a criança e, provavelmente, esses mecanismos protetores dessas células, bem como os efeitos imunomoduladores dos hormônios, presentes na secreção, se estendam para outros parasitos importantes na infância.

8. Referências

- Abdel-Hafeez EH, Ahmad AK, Basma AA et al 2012. Opportunistic Parasites among Immunosuppressed Children in Minia District, Egypt. *Korean J Parasitol* 50:57-62.
- Abdulla EM, Zaidi FE, Zaidi A 2005. Immune factors in breast milk: a study and review. *Pak J Med Sci* 21:178-86.
- Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, et al. 2001. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30:65–74.
- Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 14(3) 447-75.
- Algodão JA, Beatty JK, André G 2011. Hospedar interações parasita e fisiopatologia das infecções de Giardia. *Rev Int Parasito.* 41:925-933.
- Alum A, Rubino JR, Ijaz MK 2010. The global war against intestinal parasites-should we use a holistic approach? *Int J Infect Dis* 14(9):732-738.
- Amer AO, Swanson MS 2002. A phagosome of one's own a microbial guide to life. *Macrophage Curr Opin Microbiol* 5:56-61.
- Ames BN, Shinnenaga MK, Hagen TM 1993. Oxidants, antioxidantes, and the degenerative diseases of agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7915-22.
- Andrade F, Rode G, Filho HHS, et al 2008. Parasitoses Intestinais em um Centro de Educação Infantil Público do Município de Blumenau (SC), Brasil. Com ênfase em *Cryptosporidium* spp e outros protozoários. *Rev Patol Trop* 37:20-24.
- Andrade PA, Linhares JJ, Martinelli S, et al 2004. Resultados perinatais em grávidas com mais de 35 anos: estudo controlado. *Rev Bras Ginecol Obst* 26:697-701.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, et al 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat.Rev.Microbiol.* 8:413-22.
- Arendt J 1998. Melatonin and the pineal gland: influence mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod.* 3:13-22.
- Asad NR, Asad LMBO, Almeida CEB, et al 1994. Lethal interaction between hydrogenperoxide and 0-phenonthroline in *Escherichia coli*. *Braz J Med Biol Res* 27:2551-5.
- Astiazaran-Garcia H, Quintero J, Vega R, et al 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunol.* 31, pp.132–139.
- Azevedo GD, Freitas RAO, Freitas AKMSO, et al 2002. Efeito da idade materna sobre os resultados perinatais. *Rev Bras Ginecol Obstet* 24(3):181-5.

- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. 1973. Biological defense mechanisms. The production by leu- kocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741-744.
- Balaban G, Silva GAP 2004. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil Protective effect of breastfeeding against childhood obesity. *J Pediatric* 80:7-16.
- Baldursson S, Karanis P 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res* 45(20)6603-14.
- Bayraktar MR., Mehme, N, Durmaz R 2005. Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in patients infected with *Giardia duodenalis*. *Acta Parasitol Turcica* 29: 160–162.
- Beirigo PFS 2011. *Dosagens de melatonina e de citocinas de acordo com a via de parto*. Master's Dissertation, Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo.
- Bellinati-Pires R, Salgado MM, Hypolito IP, et al 1995 Application of a fluorochrome-lysostaphin assay to the detection of phagocytic and bactericidal disturbances in human neutrophils and monocytes. *J Investig Allergol Clin Immunol* 5: 337–342.
- Benzies KM 2008. Advanced maternal age: are decisions about the timing of child-bearing a failure to understand the risks? *CMJA*. 178:183-4.
- Besedovsky HO, Del Rey A 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:64-102
- Berg CJ, Chang J, Callaghan WM, 2003. Pregnancy- related mortality in the United States, 1991-1997. *Obstet Gynecol* 101(5):289-96.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH et al 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow up study. *Lancet* 359:564–71.
- Bilenko N, Ghosh R, Levy A, et al 2008. Amamentação parcial protege crianças beduínas da infecção e morbidade: estudo de coorte prospectivo. *Asia Pac J Clinical Nutrition* 17:243-9.
- Botelho ACF, Ferreira MC, França, JL, et al 2012. Breastfeeding and its Relationship with the Reduction of Breast Cancer: A Review. *Asian Pac J Cancer Prevention* 13:5327-32.
- Botelho ACF, França JL, Oliveira, FC, et al 2011. Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. *Parasit e Vectors* 4:62-67.
- Botelho ACF, Honorio-França AC, França EL, et al 2006. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrual leukocytes. *Acta Paediatr* 95:438-43.

- Brandtzaeg PER 2003. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 21:3382–88.
- Brasil 2011. Ministério da Saúde. *Portaria n° 2.914 de 12 de dez. de 2011*. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, MS.
- Busatti, Hgno ; Alves, Rj ; Santana-Anjos, Kg ; Gil, Ff ; Cury, MC ; Vannier-Santos, MA ; Gomes, MA 2013. Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization. *Diagn Micr Infec Dis*, 75(2):160-164
- Caetano MR, Couto E, Passini-Junior al. 2006. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *São Paulo Med J*. 124(4):181–5
- Cardona E, Castañeda S, Álvarez, ME et al 2014. Comparación de métodos convencionales y moleculares para la detección de de *Giardia lamblia* en heces humanas. *Luna Azul*.159–170.
- Carlson B, Hanson LA, 1994. Immunologic effects of breast-feeding on the infant. In: Ogra P, Strober W, Mcghee JR, Bienestock J. *Handbook of mucosal Immunology*. London: Academic Press, 1994, 653-666.
- Cartwright CP 1999. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *J.Clin. Microbiol*. 37(8):2408-11.
- Carvalho, TB de 2012. *Thaís Batista de Carvalho Efeito in vitro de inibidores de proteases sobre trofozoítos de Giardia duodenalis*. Tese ,Universidade Estadual Paulista.
- Caspari GR 1993. The influence of colostral leukocytes on the cause of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. *Vet Immunol Immunopatho*. 35:275-88.
- Cecatti JG, Aquino MMA 1998. Causas E Fatores Associados Ao Óbito Fetal. *Rev. Ciênc Méd* 7(2):43-48.
- Centeno-Lima S, Rosado-Marques V, Ferreira F et al. 2013. Giárdia Duodenalis e Desnutrição Crônica em Crianças Menores de Cinco Anos de uma Região Rural da Guiné-Bissau. *Acta Med Port* 26(3):721-24
- Chida Y, Steptoe A 2009. Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. *Biol Psychol* 80(3):265-278.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 9:11-24
- Cleary-Goldman J, Malone FD, Vidaver J et al 2005. Impact o Despaigne DN, Samanat YF 2000. Síndrome climaterico: su repercusuión social em mujeres de edad mediana. *Rev Cubana Med Genero Integral* 17:169-76
- Cleary-Goldman J, Malone FD, Vidaver J et al 2005. Impact of Maternal Age on Obstetric Outcome. *Obstet Gynecol* 105(5):983-90.
- Cohen WR 2014. Does maternal age affect pregnancy outcome? *BJOG Int.J.Obst.Gynecol*. 121, pp.252–254.

- Corrêa VSC, Maynié JC, França EL et al. 2006. Atividade funcional dos fagócitos na presença do fitoterápico “Mais Vida”. *Rev Bras Plant Med.* 8:26-3
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections. *Int J Parasitol* 41:925-33.
- Crago SS, Prince SJ, Pretlow TG et al 1979. Human colostrum cells. I. Separation and characterization. *Clin Exp Immunol.* 38:585-597.
- Cunningham AS, Jelliffe DB, Jelliffe EFP, 1991. Breast-feeding and health in the 1980: a global epidemiologic review. *J. Pediatr.* 118:659-666.
- Cutolo M, Villaggio B, Candido F et al 1999. Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP-1 cells. *Ann New York Acad Sci* 876: 246-54.
- Darney BG, Snowden JM, Cheng YW et al 2013. Elective induction of labor at term compared with expectant management: maternal and neonatal outcomes. *Obstet Gynecol* 122:761-9
- De Lima VR, Caro MSB, Munford ML et al 2010. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine - based Membranes. *J Pineal Res* 49:169-175.
- Delpisheh A, Brabin L, Attia E et al 2008. Pregnancy late in life: a hospital-based study of birth outcomes. *J Womens Health.* 17(6):965-70.
- Dubocovich M, Markowska M 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptor in mammals. *Endocrine* 27:101–10.
- DuBois KN, Abodeely M, Sakanari J et al 2008. Identification of the major cysteine protease of Giardia and its role in encystation. *J Biol Chem.* 283:18024-31.
- Durán LC, Hidalgo G, Aguilera W et al 2010. *Giardia lamblia* infection is associated with lower body mass index values. *J Infect Dev Ctries* 4:417-8.
- Edling L, Rathsman S, Eriksson S et al 2012. A doença celíaca e giardíase : relato de caso . *Rev. Eur. de Gastr. Hepato.* 24:984-87.
- Edmond K, Zandoh C, Quigley M et al 2006. Delayed breastfeeding initiation increases risk of neonatal mortality. *J Pediatrics* 117:380-6.
- Eissa MM, Amer EI 2012. Giardia lamblia: um novo alvo para miltefosina. *Rev. Int Parasitol* 42: 443-52.
- El-Gebaly NSM, Halawa EF, Moussa HME et al 2012. Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian Giardia-infected children. *Parasitol Res* 111:571-575

- El-Shazly LBE, El-Dine LB, El-Faramawy AAM et al. 2015. Intestinal parasitic infection among Egyptian children with chronic liver diseases.(Report). *J Parasitic Dis* 39(1), p.7
- Elsafi SH , Al-Maqati TN, Hussein MI et al 2013. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res* 112(4):1641-6.
- Escobedo A, Almirall P, Rumbaut R et al. 2015. Potential impact of macroclimatic variability on the epidemiology of giardiasis in three provinces of Cuba, 2010-2012. *J. Infec Public Health* 8(1):80-9.
- Escobedo AA, Almirall P, Alfonso M et al 2011. Perspectivas do cuidador para a prevenção, diagnóstico e tratamento da infância giardiase na Cidade de Havana, Cuba. Um estudo qualitativo. *Acta Tropical* 119:99-106.
- Espino J, Bejarano I, Paredes SD et al 2011. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res* 51(2):195–206.
- Espino J, Bejarano I, Redondo et al PC 2010. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: evidence for the involvement of mitochondria and bax activation. *J Membrane Biology* 233:105-118
- Everson GT, Trotter JF, Kugelmas M, et al 2003. Immunosuppression in liver transplantation. *Minerva Chir* 58:725–740.
- Fabregas R, Velbe MR, Artigas LF 1978. Duodenite Parasitárias. *Rev. Cubana de Med. Tropical*. 30:175-180.
- Fagundes DLG, França EL, Fernandes RT et al 2015. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, Cord blood and colostrum of diabetic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med*. Early on line. 1-7
- Fagundes DLG, França EL, Hara CCP et al. 2012. Immunomodulatory effects of Poly (Ethylene Glycol) microspheres adsorbed with cortisol on the activity of colostrum phagocytes. *Int J Pharmacol* 8(6):510–518.
- Faubert G 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin. Microbiol.* 13:35-40.
- Fava MN 2013. *Variabilidade genotípica dos isolados de Giardia Duodenalis em diferentes espécies de animais*. Dissertação Universidade Federal de Uberlândia. 85pp
- Fernandes CA, Grespan A, Knöbl T 2014. Cysts of *Giardia* spp . in fecal samples of psittacine birds. *ASA*. 2(3):25–32.
- Fernandes FC, Barbosa FHF 2011. Ocorrência de parasitoses intestinais entre crianças da creche menino Jesus do município de Dores do Indaiá, Minas Gerais. *Cien Equatorial* 12(4):20-4.

Field CJ 2005. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 135(1):1-4.

Foligne B, Aissaoui F, Senegal-Balas F, et al 2001. Changes in cell proliferation and differentiation of adult rat small intestine epithelium after adrenalectomy. *Dig Dis Sci*. 46:1236-1246.

França EL, Bitencourt RV, Fujimori M et al 2011a. Human colostrum phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. *J Microbiol. Immunol Infect* 44:1-7

Franca EL, Calderon IMP, Vieira EL et al 2012. Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers. *Clin Dev Med* p. 9281-87

França EL, Morceli G, Fagundes DL et al. 2011b. Secretory IgA-Fc alpha receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *APMIS*, 119:710-719.

França EL, Nicomedesb TR, Calderonc IMP et al 2010. Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk. *Biol Rhythm Res* 41(5):333–347.

França EL, Pereira Jr, Oliveira SL et al 2009. Chronoimmunomodulation of melatonin on bactericidal activity of human blood phagocytes. *Internet J Microbiol*. 6:1-13.

França EL, Feliciano ND, Silva KA et al 2009a. Modulatory Role of Melatonin on Superoxide Release by Spleen Macrophages Isolated from Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Bras Med J* 110:517-522.

França-Botelho AC, Honório-França AC, França EL et al., 2006. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrum leukocytes. *Acta Paediat*, 95(4):438-43.

Friel JK, Tsopmo A, Diehl-Jones B et al 2008. Antioxidant properties of human milk fractions. *FASEB*. 22:446.

Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, et al 2000. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* 29:129–37.

Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR et al 1997. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*. 159(2):574-81

Gardner TB, Hill DR 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 14: 114-28

Garfinkel D, Laudon M, Nof D et al 1995. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet*, 346(8974): 541–544.

- Garofalo R 2010. Cytokines in human milk. *J. Pediatr.* 156:S36-S40.
- Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp. Parasitol.* 124: 98-106.
- Gillin FD, Reiner DS, Mccaffery JM 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol.* 50:679-705.
- Goldblum RM, Goldman AS. 1994. *Handbook of mucosal immunology*. New York: Academic Press. Immunological components of milk: formation and function. p. 643–652.
- Goldman AS 2002. Evolution of the mammary gland defense system and the ontogeny of the immune system. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.*7:277-289
- Goldman AS, Ogra PL 1993. Anti-infectious and infectious agents in human milk. In: Goldman, AS. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J* 12:664-674.
- Goldman AS, Ogra PL 1993. Anti-infectious and infectious agents in human milk. In: Goldman, AS. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J* 12:664-674.
- Gomez M, Garcia CR, Ortiz Lopez R, et al 1981. Duodenite Causada por *Giardia lamblia*. *Rev. Gastr. Mexicana* 46:11-15.
- Granados CE, Reveiz L, Uribe LG et al 2012. Drugs for treating giardiasis. *Cochrane Database Syst Rev* 12: 77-87
- Gravena, AAF. et al. 2012. Resultados perinatais em gestações tardias. *Rev Esc Enferm USP*, 46(1), pp.15–21.
- Guimarães S, Sogayar MIL 1995. Ocorrência de *Giardia lamblia* em crianças atendidas em creches municipais de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 37(6):501-6, 1995.
- Guimarães S, Sogayar MIL 2002. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saude Publica.* 36(1)63-8.
- Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: 284-287.
- Hanson LA, Ashraf R, Zaman S et al 1994. Breastfeeding is a natural contraceptive and prevents disease and death in infants, linking infant mortality and birth rates. *Acta Paediat* 83:3-6.
- Hanson LA 1998. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Allergy Immunol* 81:523-33.

- Hanson LA 2007. Session 1: feeding and infant development breastfeeding and immune function. *Proc Nutr Soc India* 66:384–96
- Hara CCP, Honorio-França AC, Fagundes DLG et al 2013. Melatonin nanoparticles adsorbed to polyethylene glycol microspheres as activators of human colostrum macrophages. *J+ Nanomaterials* . 2:1-8.
- Hardeland R, Fuhrberg B 1996. Ubiquitous melatonin presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp Biochem Physiol* 2:25-45.
- Hardeland R, Pandi-perumal SR, Cardinali DP 2006. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38:313–316.
- Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ 2009. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 47:109-26.
- Hauger RL, Datzberg FM 2000. Regulation of the stress response by corticotropinreleasing factor receptors. In: Conn PM, Freeman ME, editors. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Totowa: Humana Press. 261- 87.
- Haus E, Smolensky M 2006. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control*. 17:489-500.
- Heller L, Bastos RXX, Vieira MBCM et al. 2004. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidem Serv Saude* 13(2):79–92.
- Herbinger KH, Drerup L, Alberer M, et al 2012. Espectro de importados Doenças Infecciosas entre crianças e adolescentes que retornam do Trópicos e Subtropic . *J Med Viagem*.19:150-157.
- Hiatt RA, Markell, EK, 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg* 53(1):36-9.
- Hill DR, Pearson RD 1987. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infec Imm* 55(3):155-61.
- Hofstra WA, De Weerd AW 2008. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. *Epilepsy Behav* 13, 438-444.
- Honorio-Franca AC, Carvalho MP, Isaac L et al 1997. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol* 46:59–66.
- Honorio-França AC, França EL, 2011. Human Milk : An Ecologically Functional Food. In J. I. A. Agboola, ed. *Environmental Change - Relevant Perspectives in Global Environmental Change*. Rijeka, Croatia (2)55-62.

Honorio-França AC, Hara CCP, Ormonde JVS et al 2013. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. *J Applied Biomed*, 11: 153-162.

Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MM, et al 2001. Colostral neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA. *J leukocyte biology* 69:289-296.

Honorio-França AC, Silva KA, Feliciano ND et al 2009. Melatonin effects on macrophages in diabetic rats and the maternal hyperglycemic implications for newborn rats. *Int J Diab Metabol* 17:85-90.

Huang L, Sauve R, Birkett N, Fergusson D, Walraven CV 2008. Maternal age and risk of stillbirth: a systematic review. *Can Med Assoc J* 178(2)165-78.

Hughes A, Brock JH, Parrott DMV et al 1988. The interaction of infant formula with macrophages: effect on phagocytic activity, relationship to expression of class II MHC antigen and survival of orally administered macrophages in the neonatal gut. *Immunology* 64:213-8.

Ianas O, Olinescu R, Badescu I 1991. Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie* 29:147-153.

Illnerova H, Buresova M, Presl J. 1993. *Melatonin rhythm in human milk*. *J Clin Endocrinol Metab*. 77:838-841.

Islam N, Ahmed L, Khan NI et al 2006. Immune components (IgA, IgM, IgG immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers.

Jou MJ, Peng TI, Yuzp, JR et al 2007. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 43(4), 389-403.

Jouana PN, Pouliotb Y, Gauthiera SF et al 2006. Hormones in bovine milk and milk products. *Int. Dairy J*. 16:1408-1414.

Juckett G, Trivedi R 2011. *Med Am Familia* (84)10:1119-1126.

Júlio C, Vilares A, Oleastro M et al 2012. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. *Parasit Vectors* 5:22-5.

Kamda JD, Nash TE, Singer SM, 2012. *Giardia duodenalis*: defeitos das células dendríticas de IL-6 em ratinhos deficientes contribuir para a susceptibilidade à infecção intestinal. *Parasitol. Experimental* 130:288-291.

Kim S, Elkon KB, 2004. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*. 21:643-53.

- Klemetti R, Gissler M, Sainio S et al 2014. Associations of maternal age with maternity care and birth outcomes in primiparous women: a comparison of results in 1991 and 2008 in Finland. *BJOG*:121:355–61
- Klepac N, Rudes Z, Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes 2005. *Biomed Pharmacother* 60:32-35.
- Kohut ML, Martin AE, Senchina DS, Lee W 2005. Glucocorticoids produced during exercise may be necessary for optimal virus-induced IL-2 and cell proliferation whereas both catecholamines and glucocorticoids may be required for adequate immune defense to viral infection. *Brain Behav Immun* 19:423–435.
- Kudielka BM, Wüst S 2010. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. *Stress*. 13:1-14.
- Kuhlwein E, Irwin M 2001. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol* 117:51-57.
- Kverka M, Burianova J, Lodilónova-Zadnicova R et al 2007. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clin Chem* 53:955-62.
- Labbok MH, Clark D, Goldman AS 2004. Breastfeeding: Maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nature Rev Immunology*. 4:565-73.
- Lal A, Hales S, Francês N, et al 2012. Sazonalidade Humanos Zoonoses Doenças entéricas: Uma Revisão Sistemática. *PLoS One*.7:3-9.
- Lamounier JA, Vieira GO, Govea LC 2001. Composição do Leite Humano – Fatores Nutricionais. In Rego JD Ed. *Aleitamento Materno*. São Paulo, Atheneu.47-58.
- Lim HY, Muller N, Herold MJ, Van Den Brandt J, Reichardt HM 2007. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology*. 122:47–53.
- Lindmark-Mansson H, Akesson B 2000. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr* 84:103-110.
- Long F, Wang YX, Liu L, et al 2005. Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids*.70:55-61
- Lönnerdal B 2000. Breast milk: a truly functional food. *Nutrition* 16:509-11.
- Lönnerdal B 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 77:S1537-43.

- Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, et al 2001. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 430(2-3):351-7.
- Luchetti F, Canonico B, Curci R et al 2006. Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *J Pineal Res* 40:158–167.
- Maayeh SY, Brook-Carter PT 2012. Análise de diferença representacional identifica genes específicos na interação de *Giardia duodenalis* com a linha de células do epitélio intestinal murina, IEC-6. *Rev Int.Parasitol* 42:501-509.
- Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM 2008. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(6):581- 5.
- Maestroni GJ, Sulli A, Pizzorni C et al 2002. Melatonin in rheumatoid arthritis: synovial macrophages show melatonin receptors. *Ann NY Acad Sci* 966:271-5.
- Mank T, Veenemans J, Olomi R et al 2011. Proteção contra diarreia associada com assintomática giardíase é perdido com multi-nutrientes suplementação: um estudo prospectivo entre as crianças rurais da Tanzânia. *Med Trop Int Health* 16:256-258.
- Marek A, Szlagatys A, Liberek A et al 2003. Human milk, a multipotent infant's immune system fortifier. *Med Sci Monit* 9:75-81.
- Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E 2007. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation* 14(3-4):126-33.
- Markus RP, Silva CL, Franco DG et al 2010. Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacol Ther.*126(3):251-62
- Massmann PF, França EL,Souza EG et al 2013. Maternal hypertension induces alterations in immunological factors of colostrum and human milk. *HFSP J* 7:155-163.
- Matheson JK, Schomer DL 1995. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin. Pharmacol Therapeutics* 57, 552–558.
- Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, et al 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* 14:430-435.
- Medeiros SF de, Maitelli A, Nince, APB 2007. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. *Rev Bras Ginecol Obst* 29(11)593-601
- Melo ME 2011. Ganho de Peso na Gestação . In:Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO [Internet] [cited 2014 Mar 15]. Available from <http://www.abeso.org.br/pagina/14/artigos.shtml>

- Meki AR, Saleem T, Al-Ghazali M et al. 2003. Interleukins -6, 8 and 10 and tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. *Nutrit Res* 23:845-855.
- Menezes AL, Lima VMP, Freitas MTS. et al 2008. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev.Inst.Med. Trop.*50(1)57-59.
- Mesquita Jr D, Cruvinel WM, Câmara NOS, Kállas EG, Andrade LEC 2009. Autoimmune diseases in the TH17. *Braz J Med Biol Res* 42(6):476-486.
- Mesquita Jr. D, Araújo JAP, Catelan TTT 2010. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol.* 50(5):552-80.
- Michael AE, Papageorghiou AT 2008. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update.*14(5):497-517.
- Miller RA 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 273(5271):70-4.
- Miralles O, Sánchez J, Palou A et al. 2006. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity* 14:1371-7.
- Mondal D, Minak J, Alam M et al. 2012. Contribuição de infecção entérica, função alterada da barreira intestinal, desnutrição materna e à desnutrição infantil em Bangladesh. *Clin. Infect Dis* 54:185-192.
- Moore SR, Lima AAM, Schorling JB et al. 2000. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. *Int J Infect Dis* (4):179–186.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biology.* (9):211-68.
- Morceli G, França EL, Magalhães VB et al 2011. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. *Acta Paediat* 100: 550-6.
- Morceli G, Honorio-França AC, Fagundes DLG et al 2013. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostrum phagocytes in diabetic women. *Plos One* 8:569-71.
- Mundi H, Björkstén B, Svanborg C et al 1991. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interactions with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. *Infect Imm.* 59:4168-72.
- Munhoz-Cruz 2010. Studies by S. Munoz-Cruz and co-authors describe new findings in cytokines. *Science Letter set*, p.3408.

- Nazer H Greer W, Donnelly K et al 1993. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. *Brit J Clin Practice* 47(2):76-8
- Nelson RJ, Demas GE 1996. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol*. 71(4):511-48.
- Neves DP, Melo AL, Linardi PM et al 2005. *Parasitologia humana*. São Paulo, Ed. Atheneu, 11:494
- Newburg DS 1999. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr Med Chem* 6:117-127
- Newburg DS 2005. Innate immunity and human milk. *J Nutrition* 135:1308–12.
- Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD et al 2002. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg* 66:590-593.
- Nkrumah B, Nguah SB 2011. *Giardia lamblia*: uma das principais causas de diarréia infantil parasitárias em pacientes atendidos em um hospital distrital em Gana. *Parasit Vector* 4:163-5
- Nomura RMY, Liao AW, Paiva, LV et al 2012. Influência do Estado nutricional materno, ganho de peso e Consumo energético sobre o Crescimento fetal, em gestações de alto Risco. *Rev Bras Ginecol Obstet* 34:53-6.
- Ogundele, MO 2000. Techniques for the storage of human breast milk: implications for anti-microbial functions and safety of stored milk. *Eur J Pediatr* 159:793-79.
- Oleastro M, Julio C, Vilarés A, et al 2012. Prevalência e fatores de risco para a infecção por *Giardia duodenalis* em crianças: Um estudo de caso em Portugal. *Parasit Vector* 5:22-26.
- Oliveira DM, Jesus MCP, Merighi MAB 2008b. Climatério e Sexualidade: a compreensão dessa interface por mulheres assistidas em grupo. *Texto Cont Enferm* 7:519-26
- Osiya S, Shakiba M, Anvari M et al 2011. Incidência de avaliação giardiase no jardim de infância da cidade Yazd pelo exame parasitológico microscópico e ELISA. *Acta Paediat* 100: 36-39.
- Ozkaragöz F, Rudloff HB, Rajaraman S et al 1988. The motility of human milk macrophages in collagen gels. *Pediatrics Res* 23:449-52.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V et al 2008. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 85:335–353.

Pereira M, Atwill E, Barbosa A 2007. Prevalência e fatores de risco associados para *Giardia lamblia* infecção entre crianças hospitalizadas por diarreia em Goiânia. Estado de Goiás, Brasil. *Rev. Inst Med Trop* 49:139-145.

Pereira QLC, Siqueira HCH de 2009a. Grupo terapêutico de autoajuda à mulher climatérica: uma possibilidade de educação. *Rev Min Enferm* 13(4):593–598.

Pereira QLC, Siqueira HCH de 2009b. O olhar dos responsáveis pela política de saúde da mulher climatérica. *Anna Nery* 13(2):366–371.

Pereira, QLC, Siqueira HCH de 2011. Acesso à mamografia: percepções dos responsáveis pela política da saúde da mulher. *Rev Min Enferm* 15 (3):365–371.

Peschke E, Hofmann K, Pönicke K et al 2012. Catecholamines are the key for explaining the biological relevance of insulin–melatonin antagonisms in type 1 and type 2 diabetes. *J Pineal Res* 52:389-396.

Peyrot F, Ducrocq C 2008. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 45, 235-246.

Poffenbarger EM. et al 1991. Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. *Am J Vet Res* 52:1221-1224.

Polisseni AF, Ferraz ST, Grünewald T et al 2009. Depressão e ansiedade em mulheres climatéricas: fatores associados. *Rev Bras Gin e Obst.* 31:28-34.

Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS et al 2006. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res* 41:136-141, 2006.

Poon AM, Liu ZM, Pang CS et al 1994. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol Signals* 3:107-17.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR et al. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 65: 430–42.

Prucca G, Rivero FD, Luj HD 2011. Regulation of Antigenic Variation in *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol.* 65:611–630.

Quihui L, Morales GG, Mendez, RO et al 2010. Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health* 10:85–91.

Radogna F, Cristofanon S, Paternoster L et al 2008. Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. *J Pineal Res* 44:316–325.

- Rady MY, Jhonson DJ, Patel B et al. 2006. Corticosteroids influence the mortality and morbidity of acute critical illness. *Crit Care* 10
- Rayan P, Stenzel D, McDonnell PA 2005. The effects of saturated fatty acids on *Giardia duodenalis* trophozoites in vitro. *Parasitol Res* 97 p.191.
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M et al. 2000. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann NY Acad Sci* 917:376-386.
- Reul JM, Stec I, Söder M et al 1993. Chronic treatment of rats with antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology* 133: 312–320
- Rivas D, Riestra-Noriega JL, Torre-Alonso JC et al 1994. Decrease in detectable complement receptor type 1 levels on erythrocytes from patients with psoriatic polyarthritis. *Rheumatology* 33:626-630
- Rivera M, Da La Parte MA, Hurtado P et al 2002. Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión. *Invest Clin* 43:119-128.
- Rivero MR, Miras SL, Quiroga R et al 2011. *Giardia duodenalis* low-density lipoprotein receptor-related protein is involved in selective lipoprotein endocytosis and parasite replication. *Mol Microbiol* 79 (5): 1204–1219.
- Robertson LJ, Hanevik AAK, Escobedo K et al 2010. Giardiasis—why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol* 26:75–81.
- Robinson JE, Volovitz B, Passwell JH 1991. Identification of a secretory IgA receptor on breast-milk macrophages: Evidence for specific activation via receptors. *Pediatrics. Res* 29:429-34.
- Rodas B., 2014. Prevalencia de Giardiasis intestinal en niños comprendidos entre 2- 5 años de edad en el Hospital San Juan de Dios de Redencion Pampa del municipio de Mojocoya 2010. In: Ramos M, Serrudo J.(eds.) *Ciencias de la Salud*, Handbooks - p.373–404.
- Rodríguez-García R, Rodríguez-Guzmán LM, Sánchez-Maldonado MI et al 2002. Prevalencia y factores de riesgo asociados a parasitosis intestinal en mujeres embarazadas y su relación con el peso del niño al nacer. *Ginecol Obstet Méx* 70(7):338-343.
- Rogers N, Van der Heuvel C, Dawson D 1997. Effect of melatonin and corticosteroid on in vitro cellular immune function in humans. *J Pineal Res* 22:75-80.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10, 423–433.
- Rópolo AAS, Touz MCA 2010. Lesson in Survival, by *Giardia lamblia*. *Sci World J.* 10:2019-31.

Roxström K, Palm D, Reiner, D et al 2006. Giardia immunity – an update. *TIP* 22(1):26-31.

Sadeghi H, Borji H 2015. A survey of intestinal parasites in a population in Qazvin, north of Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 5(3):231–233.

Salazar-Molina A, Klijn TP, Delgado JB 2015. Sexual satisfaction in couples in the male and female climacteric stage Satisfacción sexual en parejas durante el climaterio femenino y masculino Satisfação sexual nos casais durante o climatério feminino e masculino. *Cad Saude Publica* 31(2):311–320.

Salmon H 1999. The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 72:143-155.

Santana LA, Vitorino RR, Antônio, VE et al. 2014. Atualidades sobre giardiase. *JBM*, 102:7–10.

Santos SMR, Ferreira TL, Quintal, VS et al. 2013. Milk from Brazilian women presents secretory IgA antibodies and neutralizes rotavirus G9P[5]. *J Ped* 89(5):510–513

Sathasivam S 2008. Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. *Nat Clin Pract Neurol* 4:317–327.

Shahriar F, Ngeleka M, Gordon JR, et al 2006. Identification by mass spectroscopy of F4ac-fimbrial-binding proteins in porcine milk and characterization of lactadherin as an inhibitor. *Dev Comp Immunol* 30(8):723-34

Silva RKNR, 2014. *Avaliação da etiologia das infecções enteroparasitárias em diferentes grupos pediátricos e genotipagem de isolados de Giardia duodenalis*, Dissertação, Universidade Federal da Bahia, pp.118

Singer SM, Nash TE, 2000. T-Cell-Dependent Control of Acute Giardia lamblia Infections in Mice T-Cell-Dependent Control of Acute Giardia lamblia Infections in Mice. *Infect Immunol* 68(1):170–175.

Skwarlo-Sonta K. Bi-directional communication between pineal gland and immune system. *J Physiol* 2002; 543: 6S-7S

Smith HV, Caccio SM, Tait A et al 2006. Tools for investigating the environmental transmission of Cryptosporidium and Giardia infections in humans. *Trends Parasitol* 22(4):160-7.

Smyth GP, Stapleton PP, Freeman TA et al 2004. Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *J Surg Res* 116:253–261.

Solaymani-Mohammadi S, Genkinger JM, Loffredo CA et al, 2010. A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5):682-92.

Solórzano-Santos F, Castellanos-Cruz RC, Echaniz-Avilés G, et al 1993. Antimicrobial activity of human colostrum against enteropathogens. Preliminary study. *Rev Latin Microbiol* 35:1-6.

Souza VMO, Vendas IRF, Peixoto DM et al 2012. *Giardia lamblia* e alergias respiratórias: um estudo de crianças de uma área urbana com alta incidência de infecções por protozoários. *J Pediatría*. 88:233-8.

Straub RH, Cutolo M, Zietz B et al 2001. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev* 122(14):1591-611

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B et al 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1, 57–60.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP et al 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 42, 28– 42.

Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC et al 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2:181–98.

Tan S, Sagara Y, Liu Y et al 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423–32.

Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW et al 2009. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*. 46(3):268-74.

Tashima NT, Simoes MJS, Leite CQF et al. 2009. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Ver Inst Med Trop São Paulo*. 51(1):19-24.

Tellez A, Winiecka Krusnell J, Paniagua ME 2005. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. *Parasite immunol* 27:163-9.

Thompson RC 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*. 30(12):1259-67.

Thompson RC 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol*. 126(2):15-35

Thorpe LW, Rudloff, HE, Powel LC et al 1986. Decreased response of human milk leukocytes to chemoattractant peptides. *Pediatrics Res* 20:373-7.

Trahair JF, Perry RA, Silver M, et al 1987. Studies on the maturation of the small intestine of the fetal sheep. I. The effects of bilateral adrenalectomy. *Quarterly J Exp Physiol* 72:61-69.

Troeger H, Epple HJ, Schneider T et al 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*. 56:328-35.

Tsigos C, Chrousos GP 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865- 871.

Tsuda H, Dickey WD, Goldman AS 1984. Separation of human colostrum macrophages and neutrophils on gelatin and collagen-serum substrate. *Cell Struct Funct* 8:367-71.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Lida T, Cho S, Honma K, Kondo T 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 27:838-49.

Vasconcelos LS, Sabino KR, Petroianu, A et al. 2003. Atividade fagocitária do sistema mononuclear fagocitário na gravidez. *Medicina* 25(4):213-218.

Vaughan DA, Cleary BJ, Murphy DJ 2014. Delivery outcomes for nulliparous women at the extremes of maternal age - a cohort study. *BJOG*.121:260-7.

Viana SGF, Sogayar MITL 2011. Giardia. In: NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 12. ed. São Paulo: Atheneu.

Vieira PDB, Brandelli CLC, Veríssimo CM et al. 2012. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de Mucosa. *Rev HCPA* 32(1).70-6

Walker WA 1999. Human Milk as carrier of biochemical messages. *Acta Paediatr*. 430 (suppl:) 27-41.

Watts NB, Tindall GT 1988. Rapid assessment of corticotrophin reserve after pituitary surgery. *JAMA*. 259-708.

Wlak ST 1998. *Microbiology* McGraw-Hill, 460-461.

Woods JQ, Lu MA, Coddia LT, 2000. Special feature for the Olympics: effects exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol* 78:545-553.

Wright SG 2012. Protozoan infections of the gastrointestinal tract. *Infect Dis Clin North Am* 26(2):323-39.

Yarden N, Eckmann L 2011. Novas abordagens para o tratamento da giardíase. A opinião corrente em doenças infecciosas. *Res Gate*, 24:451-56.

Yeaman GR, Kerr MA 1987. Opsonization of yeast by human serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Clin Exp Immunol* 68:200-208.

Yu Q, Miller SC, Osmond DG 2000. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J Pineal Res* 29, 86-93.

Yu Z, Palkovicova L, Drobná B et al. 2007. Comparison of organochlorine compound concentrations in colostrum and mature milk. *Chemosphere*. 66(6)1012-8.

Xanthou M 1998. Immune protection of human milk. *Biol Neonate* 74(2)121-33.

Zaiden MF, Santos BMO, Cano MAT et al 2005. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde-GO. *Medicina (Ribeirão Preto)* 182-7, 2005.

Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ et al 1995. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther* 57:552-558.

Zhou C, Tabb MM, Nelson EL et al. 2006. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J Clin Invest* 116: 2280-9.

Ziegler EE 2011. Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Ann Nutr Metab*. 58(suppl 1):8-18.

9. Anexos