

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA MELATONINA NAS**  
**INTERAÇÕES ENTRE TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba***  
***histolytica* E *Entamoeba dispar* COM CÉLULAS**  
**SANGUÍNEAS**

***Aline do Carmo França Botelho***

**Belo Horizonte - MG**

**2009**

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA MELATONINA NAS  
INTERAÇÕES ENTRE TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica* E  
*Entamoeba dispar* COM CÉLULAS SANGUÍNEAS**

**Aline do Carmo França Botelho**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Parasitologia.**

**Área de Concentração: Protozoologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes**

**043**                    **França-Botelho, Aline do Carmo.**

Avaliação da interferência da melatonina nas interações entre trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* com células sanguíneas. [manuscrito] / Aline do Carmo França-Botelho. – 2009.

117 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Aparecida Gomes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. *Entamoeba histolytica* – Teses. 2. *Entamoeba dispar*. 3. Fagocitose – Teses. 4. Superóxido – Teses. 5. Superóxido desmutase – Teses. 6. Melatonina – Teses. 7. Trofozoítos. I. Gomes, Maria Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. III. Título.

CDU:576.88/.89

*Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) e no Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário do Planalto de Araxá, Araxá (MG), sob a orientação da Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).*

## DEDICATÓRIA

*A minha querida filha, Larissa, por me fazer experimentar o maior amor que o ser humano pode sentir.*

*Aos meus pais, Nilda e Antonio Gama; meus mestres na vida diária, desde muito cedo estimularam em mim o gosto pelo conhecimento.*

*Ao meu marido, Helvécio Jr, pelo amor, amizade, respeito e compreensão, mas, acima de tudo, por tomar os meus sonhos como seus, e ser luz constante em meu caminho.*

*Aos meus irmãos, Juliana, Eduardo e Fernando; companheiros fiéis em todos os momentos da minha vida, extensões de mim mesma.*

*Aos meus queridos sobrinhos: Lucas, Danielle e Emmanuelle, por tantos momentos  
alegres em família.*

*Aos meus avós, que mesmo ausentes, tenho certeza que, espiritualmente, torcem  
por mim.*

*Enfim, dedico a toda minha família, de antes e depois do casamento, pois todos  
você, não apenas formam a minha história, mas também são partes do que sou.*

### ***Agradecimento especial***

*Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa de seu atual coordenador, Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira, por essa oportunidade!*

## AGRADECIMENTOS

*Este trabalho é resultado do empenho de muitas pessoas, colaboradores diretos e indiretos, que juntos transformaram um projeto em realidade, agradeço a todos, em especial:*

- *À Deus, por ser minha fonte de iluminação nos momentos de dificuldades e dúvidas.*
  
- *À Dra. Maria Aparecida Gomes, orientadora e amiga, agradeço a confiança, respeito e compreensão durante todo esse tempo. Sou grata por me ajudar muito antes de ser minha orientadora, jamais vou esquecer o que fez por mim também no meu mestrado. Quero que saiba que embora a nossa convivência tenha sido menor do que eu gostaria, em razão do meu trabalho, você provou que existem muitas formas de estar presente.*
  
- *Ao Sr. João da Costa Viana, do laboratório de Amebíase da UFMG, pela participação no projeto, sempre gentil e disposto a colaborar.*



- *À Juliana Luzia França, presença fundamental durante a execução das atividades laboratoriais, não medindo esforços e horas de dedicação. Serei eternamente grata por tudo que fez por mim, que Deus possa recompensá-la por tanta generosidade e desprendimento.*
  
- *Ao Dr. Eduardo L. França e à Dra. Adenilda C. H. França, ex-professores do Centro Universitário do Planalto de Araxá (UNIARAXÁ), meus sinceros agradecimentos pelo incentivo.*
  
- *Ao Filipe A. Mesquita e Haendel G. N. O. Busatti, pela grande contribuição dada a este trabalho, agradeço pelo interesse e disponibilidade durante os testes in vivo.*
  
- *Ao Prof. Ms. Luiz Carlos T. Rodrigues, e as alunas, Rafaela A. de Castro e Lislen M. Goulart, do UNIARAXÁ, por ajudarem no desenvolvimento de alguns experimentos.*
  
- *Aos professores Dr. Evaldo Nascimento e Dr. Alan Lane, da UFMG, pelo desenvolvimento da atividade de campo em Januária (MG), foi uma experiência inesquecível e um aprendizado de valor incalculável.*

- *Aos colegas de pós-graduação, especialmente agradeço à Fernanda Silva Costa, amiga sincera e carinhosa.*
  
- *A secretária da Pós-graduação em Parasitologia da UFMG, Sumara A. G. Ferreira, sempre simpática e atenciosa, sou grata pela atenção e carinho com que sempre me atendeu.*
  
- *Ao Centro Universitário do Planalto de Araxá pelo amplo apoio concedido.*
  
- *E, por fim, também agradeço aos voluntários que gentilmente se dispuseram a participar dessa pesquisa.*

*“Se enxerguei mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes”.*

*Isaac Newton*

*Fazer ciência é buscar o incerto.  
É pensar o que nunca foi pensado.  
É olhar e ver o que ninguém reparou.  
É o encontro com o inesperado.  
Ciência é um criar constante.  
É persistência, é determinação.  
Fazer ciência é desafiar.  
É ousadia, questionamento, inquietude.  
Ciência é desprendimento, doação, partilha.  
Fazer ciência pode ser também satisfação, recompensa, imortalidade.  
Ciência é também esperança para quem nem sabe o seu significado.*

*Aline Botelho*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Amebíase.....	01
1.1.1. Aspectos históricos e epidemiológicos.....	01
1.1.2. Morfologia e biologia do parasito.....	03
1.1.3. Patogenia, virulência e resposta imune.....	07
1.1.4. Manifestações clínicas.....	11
1.1.5. Diagnóstico e tratamento.....	13
1.2. Leucócitos e Estresse Oxidativo.....	14
1.3. Melatonina.....	21
2. OBJETIVOS.....	29
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Culturas de <i>E. histolytica</i> .....	32
4.2. Obtenção de células do sangue periférico.....	33
4.3. Ensaio de eritrofagocitose.....	34
4.4. Ensaio de leucofagocitose .....	34
4.5. Dosagem do Ânion Superóxido ( $O_2^-$ ) .....	35
4.6. Dosagem da enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	36
4.7. Modulação hormonal e delineamento das interações <i>in vitro</i> .....	37
4.8. Avaliação da melatonina em infecções experimentais em Hamsters .....	38
4.8.1. Infecção dos hamsters com <i>Entamoeba histolytica</i> .....	38
4.8.2. Tratamento com melatonina.....	39
4.9. Análise estatística.....	41

5. RESULTADOS.....	42
5.1. Eritrofagocitose.....	42
5.2. Leucofagocitose.....	44
5.3. Dosagem do Ânion Superóxido.....	50
5.4. Dosagem da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	60
5.5. Efeito da melatonina em infecções experimentais em Hamsters.....	70
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
9. ANEXOS.....	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Cistos e trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	04
<b>Figura 2</b> - Ciclo de vida do parasito.....	06
<b>Figura 3</b> - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante interações entre células mononucleares e polimorfonucleares com trofozoítos de <i>E. histolytica</i> e de <i>E. dispar</i> .....	53
<b>Figura 4</b> - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante as interações entre a cepa HM1 de <i>E. histolytica</i> e células sanguíneas mononucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona.....	54
<b>Figura 5</b> - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante as interações entre a cepa ICB-32 de <i>E. histolytica</i> e células sanguíneas mononucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona.....	55
<b>Figura 6</b> - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante as interações entre a cepa ICB-ADO de <i>E. dispar</i> e células sanguíneas mononucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona.....	56
<b>Figura 7</b> - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante as interações entre a cepa HM1 de <i>E. histolytica</i> e células sanguíneas polimorfonucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona.....	57
<b>Figura 8</b> - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante as interações entre a cepa ICB-32 de <i>E. histolytica</i> e células sanguíneas polimorfonucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona.....	58

- Figura 9** - Médias das concentrações de ânion superóxido liberadas durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas polimorfonucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 59
- Figura 10** - Concentrações de superóxido dismutase durante interações entre leucócitos mononucleares e polimorfonucleares com trofozoítos de *E. histolytica* e de *E. dispar*..... 63
- Figura 11** - Concentrações de superóxido dismutase durante as interações entre a cepa HM1 de *E. histolytica* e células sanguíneas mononucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 64
- Figura 12** - Concentrações de superóxido dismutase durante as interações entre a cepa ICB-32 de *E. histolytica* e células sanguíneas mononucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 65
- Figura 13** - Concentrações de superóxido dismutase durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas mononucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 66
- Figura 14** - Concentrações de superóxido dismutase durante as interações entre a cepa HM1 de *E. histolytica* e células sanguíneas polimorfonucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 67
- Figura 15** - Concentrações de superóxido dismutase durante as interações entre a cepa ICB-32 de *E. histolytica* e células sanguíneas polimorfonucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 88



**Figura 16** - Concentrações de superóxido dismutase durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas polimorfonucleares, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 69

**Figura 17** - Fígado de hamsters inoculados com a cepa HM1 de *E. histolytica*, sem tratamento com melatonina (A) e tratado com melatonina (B)..... 72

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Capacidade eritrofagocítica de *E. histolytica* e *E. dispar* em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 43
- Tabela 2** - Capacidade de *E. histolytica* e *E. dispar* realizar leucofagocitose..... 45
- Tabela 3** - Interferências da melatonina e cortisona na aderência entre amebas e leucócitos mononucleares e polimorfonucleares..... 46
- Tabela 4** - Interferências da melatonina e cortisona na capacidade fagocítica das amebas em interações com leucócitos mononucleares e polimorfonucleares..... 47
- Tabela 5** - Interferências da melatonina e da cortisona nos percentuais de leucócitos mortos durante a internalização..... 48
- Tabela 6** - Interferências da melatonina e cortisona nos índices de amebas mortas durante a internalização de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares..... 49
- Tabela 7** - Liberação espontânea de  $O_2^-$  por trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, bem como, por leucócitos, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 52
- Tabela 8** - Liberação espontânea de SOD por trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, bem como, por leucócitos, em presença e ausência de melatonina e cortisona..... 62

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

CF: *Crithidia fasciculata*

COR: Cortisona

COX 2: cicloxigenase 2

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EH29: peroxidase tiol-dependente

ELISA: ensaio imunoenzimático

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

Fe-SOD: Superóxido dismutase associada ao ferro

HM1: HM1-IMSS

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IL: interleucina

LPPG: Lipopeptidofosfoglicana

MEL: Melatonina

MN: mononucleares

NAT: N-acetiltransferase

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear Kappa Beta

NK: células “natural killer”

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: *phosphate buffered saline*

PMA: *Phorbol 12-myristate-13-acetate*

PMN: polimorfonucleares

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

SOD: superóxido dismutase

TLR: toll-like receptor

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TYI-S-33: Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum

## RESUMO

A amebíase é uma importante enfermidade parasitária, ocasionando morbidade e mortalidade significativas. Dentre os protocolos sugeridos para quantificar a virulência dos isolados de *Entamoeba histolytica* está a capacidade eritrofagocítica, mas pouco é conhecido quanto a capacidade de leucofagocitose. O presente estudo objetivou verificar a capacidade de eritrofagocitose e leucofagocitose de trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, dosar o superóxido ( $O_2^-$ ) e a enzima superóxido dismutase (SOD), em presença e ausência de melatonina. Além disso, buscou-se conhecer a ação da melatonina na amebíase experimental. Para os testes *in vitro* foram coletadas amostras de sangue periférico humano e separados os tipos celulares em: eritrócitos, leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN). Trofozoítos de *E. histolytica* (cepas HM1-IMSS e ICB-32) e de *E. dispar* (cepa ICB-ADO) foram incubados com as células. Para dosagem do  $O_2^-$  foi usado o cromógeno Ferricitocromo C e a dosagem da SOD foi através da técnica de redução do NBT (Nitro Blue Tetrazolium). Na amebíase experimental foram utilizados hamsters machos que foram inoculados intra-hepaticamente com amebas da cepa EGG e HM1-IMSS de *E. histolytica*. As lesões produzidas nos animais foram analisadas de acordo com o grau de comprometimento hepático. Grupos de animais foram tratados com melatonina, em diferentes doses e vias de inoculação. Os resultados *in vitro* mostraram que a eritrofagocitose foi maior para a cepa HM1-IMSS, bem como o número de eritrócitos internalizados. Quanto à leucofagocitose, os resultados também foram também mais expressivos para a cepa HM1-IMSS, considerando a aderência, fagocitose e morte de leucócitos. Foram observadas interferências hormonais pela melatonina, tanto na leucofagocitose, quanto nos níveis de  $O_2^-$  e de SOD. A inoculação de melatonina nos animais não provocou

alterações significativas das lesões hepáticas observadas macroscopicamente, o que pode indicar que *in vivo* as amebas podem apresentar meios eficazes de escape do sistema imune. O universo das interações amebas-leucócitos ainda está longe de ser completamente desvendado, mas encontramos algumas respostas interessantes e surgiram perspectivas para investigações futuras, como conhecer melhor os mecanismos de escape que o parasito utiliza *in vivo* para evadir das respostas imunes do hospedeiro.

## ABSTRACT

Amoebiasis is an important parasitic disease that accounts for significant morbidity and mortality in humans. The virulence of *Entamoeba histolytica* is commonly determined based on its capacity for erythrophagocytosis. However, its capacity for leukophagocytosis is still poorly understood. The present study assessed the capacity for erythrophagocytosis and leukophagocytosis of *E. histolytica* and *E. dispar* trophozoites and determined the levels of superoxide ( $O_2^-$ ) and superoxide dismutase enzyme (SOD) with and without melatonin. In addition, an investigation about melatonin action on experimental amoebiasis was performed. For *in vitro* tests, peripheral human blood samples were collected from adults and separated into cell types: erythrocytes, mononuclear (MN) and polymorphonuclear (PMN) leukocytes. *E. histolytica* trophozoites (HM1-IMSS and ICB-32 strain) and *E. dispar* trophozoites (ICB-ADO strain) were added to these cells and incubated. Ferricytochrome C was used as chromogen for  $O_2^-$  determination, and the Nitroblue Tetrazolium reduction test for SOD determination. The male hamsters used in experimental amoebiasis were inoculated intrahepatically with *E. histolytica* amoebas (EGG and HM1-IMSS strain). The lesions produced in the animals were analyzed according to the degree of hepatic damage they caused. Groups of animals were treated daily with melatonin, which was administered at different concentrations and inoculation routes. *In vitro* results indicate that erythrophagocytosis and the number of internalized erythrocytes were higher in the human blood cells infected with the HM1-IMSS strain. With respect to leukophagocytosis, HM1-IMSS was also the most aggressive strain in terms of adherence, phagocytosis and leukocyte death. Hormonal interference of melatonin, was detected for leukophagocytosis and in  $O_2^-$  and SOD levels. Melatonin inoculation in the animals did not affect hepatic lesions significantly when observed

macroscopically, suggesting that *in vivo* amoebas are able to evade the host immune system. The universe of amoeba-leukocyte interactions is far from being completely elucidated, but the present study found interesting responses and opened perspectives for future research, such as the investigation of the evasion mechanisms that parasites use to escape from host immune responses *in vivo*.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Amebíase

### 1.1.1. Aspectos históricos e epidemiológicos

Os primeiros relatos científicos referentes à amebíase são do século XIX. Através de estudos microscópicos e clínicos, Lösch (1875) associou disenteria à presença de trofozoítos nas fezes, os quais foram denominados de *Amoeba coli*. Köch e Graffki (1887) relataram a invasão de tecidos por amebas e Councilman e Lafleur (1891) descreveram o processo patológico associado à invasão amebiana no fígado. Estes autores também descreveram detalhadamente as amebas causadoras das lesões e nomearam-nas de *Entamoeba dysenteriae*.

No início do século XX havia controvérsias quanto à nomenclatura das amebas. Schaudinn (1903) renomeou *E. dysenterie* como *Entamoeba histolytica*, além de ter descrito outra espécie de ameba, *Entamoeba coli*, sendo esta não patogênica. Craig (1905) considerou que o nome *E. dysenteriae* era prioritário sobre *E. histolytica*. Entretanto, Walker (1911) redescreveu as amebas intestinais confirmando a denominação *E. histolytica* e distinguindo-a da *E. coli* através do número de núcleos dos cistos das duas espécies.

Brumpt (1925) propôs a existência de duas espécies do gênero *Entamoeba* que eram semelhantes na sua morfologia, infectantes para o homem, sendo uma patogênica e outra não patogênica. Seus estudos foram baseados na constatação de que muitos pacientes aparentemente infectados por *E. histolytica* eram assintomáticos e espontaneamente livravam-se da infecção. Brumpt denominou a espécie não patogênica de *Entamoeba dispar*. Porém, considerando que os

caracteres morfológicos entre as duas espécies são idênticos, a idéia proposta por ele não foi bem aceita pela comunidade científica da época.

Entretanto, foi somente no ano de 1997, no seminário sobre amebíase realizado no México, que a Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente com pesquisadores da área, confirmou a existência da *E. dispar* (OMS, 1997).

A amebíase é uma importante enfermidade parasitária, causada pelo protozoário entérico *E. histolytica*, amplamente difundido em todo o mundo, embora seja mais incidente em locais onde o saneamento básico é inadequado. Em países desenvolvidos esse protozoário parasito é visto principalmente em viajantes para áreas endêmicas e emigrantes. A doença ocasiona morbidade e mortalidade significativas, afeta cerca de 50 milhões de pessoas e resulta na morte de aproximadamente 100.000, anualmente, em todo o mundo (OMS, 1997; STANLEY-JR, 2003; VAN-HAL *et al.*, 2007; PRITT; CLARK, 2008).

*E. histolytica* infecta pessoas de ambos os sexos e de todas as idades, entretanto, o risco da população pode variar de acordo com a localização geográfica, susceptibilidade do hospedeiro e diferenças de virulência do organismo (PRITT; CLARK, 2008).

Altas taxas de infecção são encontradas na Índia, África, América Central e do Sul. No Brasil, a amebíase apresenta grande diversidade no número de indivíduos infectados ou com sintomatologia da doença, variando de região para região. De forma geral varia de 2,5 a 11%, mas é importante salientar que índices próximos de 20% podem ser encontrados na região amazônica (SILVA; GOMES, 2005).

### 1.1.2. Morfologia e biologia do parasito

Trata-se de protozoário pertence ao sub-filo Sarcodina, tendo forma amebóide e locomovendo-se através de pseudópodes. O trofozoíto tem em média de 20 a 40 micrômetros, podendo chegar a até 60 micrômetros nas formas invasivas (Figura 1). Geralmente tem apenas um núcleo, bem nítido quando corado, mas pouco visível em preparações a fresco. Nessas preparações, os trofozoítos são pleomórficos, com rápida emissão de pseudópodes, grossos, hialinos, parecendo deslizar na superfície da lâmina (SILVA; GOMES, 2005).

A ingestão de alimentos se dá por pinocitose (partículas líquidas) e fagocitose de bactérias e restos celulares. Entretanto, nas formas invasivas de amebíase também é freqüente a eritrofagocitose e a leucofagocitose. O processo de fagocitose inicia-se com a ligação da lectina Gal/GalNAc (OKADA *et al.*, 2005) e para que ocorra a degradação, os amebaporos e as cisteína proteinases são recrutados para os fagossomas (QUE *et al.*, 2002; ANDRA; HERBST; LEIPPE, 2003).

Os cistos são esféricos com cerca de 10 a 16 micrômetros de diâmetro, apresentando de um a quatro núcleos. Quando maduros têm quatro núcleos (Figura 1). Há reserva energética (glicogênio) em um vacúolo distinto no cisto imaturo, tornando-se difuso nos cistos maduros (DIAMOND; CLARK, 1993). A parede celular dos cistos é composta de quitina (RAVDIN, 1995). No meio ambiente podem sobreviver por semanas ou meses, principalmente quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis. Eles sofrem degeneração em temperaturas menores que 5°C e maiores que 40°C (TANYUKSEL; PETRI, 2003).



**Figura 1.** A, B e C: Cistos. D: Trofozoíto ingerindo eritrócitos. E: Trofozoíto corado com tricrômio. Adaptado de Haque *et al.* (2003).

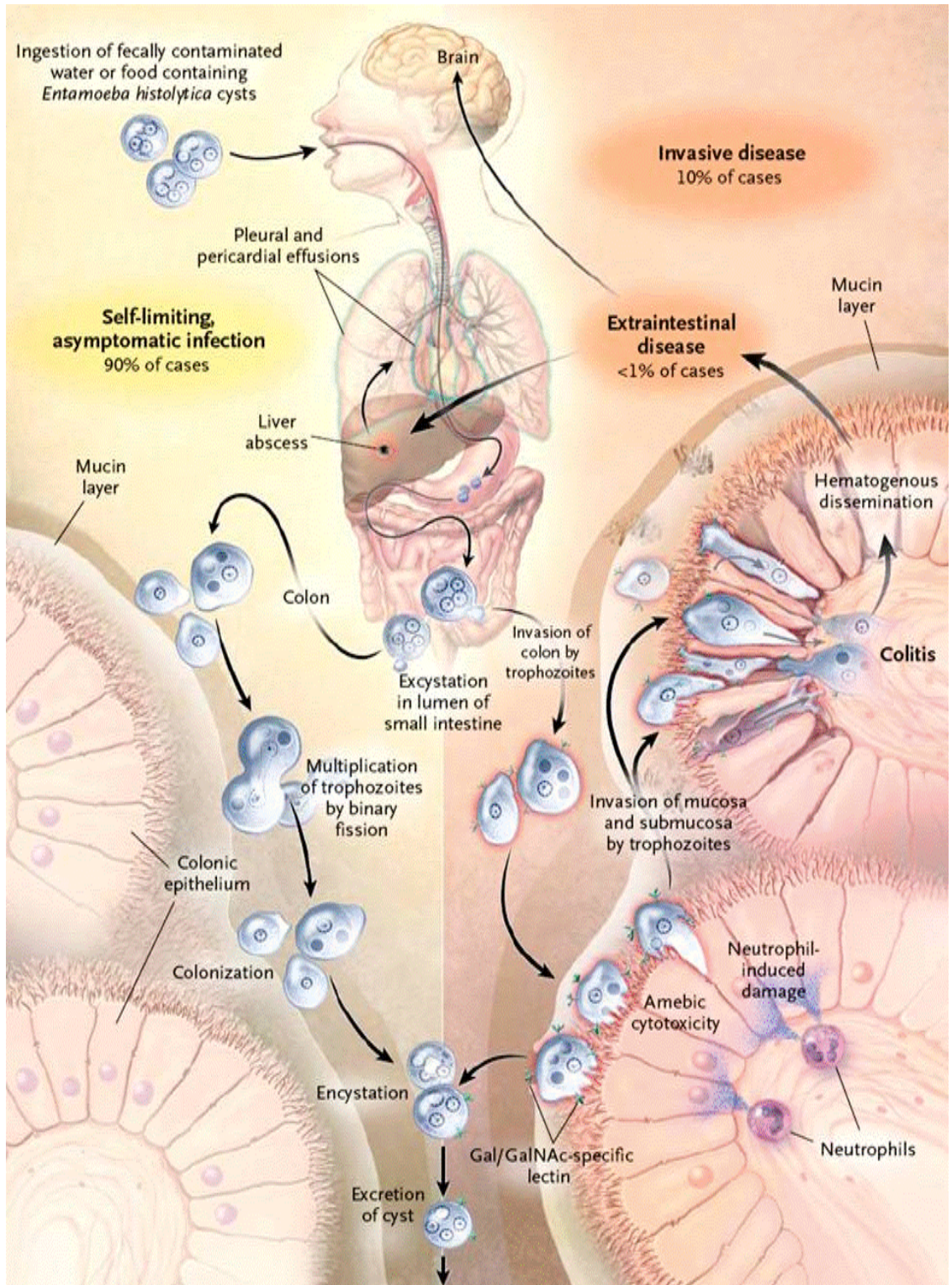
*E. histolytica* é morfologicamente indistinguível de *E. dispar*, entretanto vários trabalhos mostraram diferenças bioquímicas e genéticas (TANNICH *et al.*, 1989; CLARK; DIAMOND, 1991; GOMES *et al.*, 1997; SRIVASTAVA, *et al.*, 2005). Além disso, *E. dispar* tem sido descrita como não causadora de doença, os trofozoítos colonizam o intestino, mas os pacientes são assintomáticos (SARGEAUNT; WILLIAMS; GREENE, 1978; TANNICH *et al.*, 1989; MAK, 2004).

As evidências de diferenças genéticas culminaram para a diferenciação das duas espécies, e conseqüentemente, a denominação *E. dispar*, para a comensal e *E. histolytica*, para a patogênica foi estabelecida (CLARK; DIAMOND, 1991; BURCH *et al.*, 1991).

O ciclo de vida do parasito é monoxênico e relativamente simples (Figura 2). A infecção se inicia com a ingestão de cistos provenientes de água e alimentos contaminados, sendo eles resistentes à ação do suco gástrico. O desencistamento

ocorre no intestino delgado, com a saída do metacisto, através de uma pequena fenda na parede cística. O metacisto sofre sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, dando origem aos trofozoítos. Eles migram para colonizar o intestino grosso. Neste local eles podem se desprender da mucosa, sofrer desidratação e se transformar em pré-cistos, em seguida, secretam uma membrana cística e se transformam em cistos. Inicialmente os cistos são mononucleados, mas posteriormente sofrem divisões nucleares, tornando-se tetranucleados, que são eliminados com as fezes, completando o ciclo (RAVDIN, 1995).





**Figura 2.** Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. Fonte: Haque et al. (2003).

### 1.1.3. Patogenia, virulência e resposta imune

Para causar lesões, inicialmente os trofozoítos aderem ao muco intestinal e células epiteliais por mecanismos mediados por lectinas. A lectina que parece contribuir de forma mais significativa para a adesão é a Gal/GalNAc (MCCOY *et al.*, 1994; LEJEUNE *et al.*, 2009).

Após o contato íntimo, polipeptídeos chamados amebaporos são liberados pelo parasito. Os amebaporos estão constitutivamente presentes no citoplasma dos trofozoítos (GONZÁLEZ *et al.*, 2008) são capazes de induzir apoptose e necrose de células eucarióticas e também apresentam atividade antibacteriana (LEIPPE; MULLER-EBERHARD, 1994).

A inibição da expressão do amebaporo em trofozoítos de *E. histolytica* reduziu expressivamente a capacidade lítica sobre hemácias e células renais de hamster, bem como, a capacidade de produzir zonas de necrose liquefativa hepática (BRACHA *et al.*, 1999).

Há evidência de um papel central das cisteínas proteinases como fator de virulência para *E. histolytica*, estando envolvidas no rompimento da barreira de muco, o que é fundamental na patogênese da amebíase (MONCADA *et al.*, 2006; LEJEUNE *et al.*, 2009). As enzimas proteolíticas secretadas pelo parasito rompem o muco e a barreira epitelial, facilitando a penetração no tecido (QUE; REED, 2000). A combinação destas moléculas e talvez de alguns outros fatores ainda desconhecidos, conduzem à formação de úlceras e a migração subsequente da ameba para o fígado e outros locais (STANLEY-JR, 2001).

A caracterização de diferentes cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* quanto à virulência pode ser realizada de várias formas. As principais formas são: a capacidade de induzir “abscesso” em fígado de hamster, a eritrofagocitose e o efeito

citopático sobre células VERO. É importante considerar as características biológicas ou funções do parasito, essas características ou funções podem estar relacionadas com mecanismos patogênicos que ocorrem no desenvolvimento de amebíase invasiva (GOMES *et al.*, 1997).

Quanto à interação com o sistema imune, uma molécula de superfície denominada Lipopeptidofosfoglicana (LPPG) de *E. histolytica* foi descrita como sendo capaz de ser reconhecida pelos receptores toll-like receptor (TLR) 2 e 4 dos leucócitos favorecendo uma resposta inflamatória (MALDONADO-BERNAL *et al.*, 2005).

A invasão dos tecidos pelos trofozoítos de *E. histolytica* induz resposta imune humoral, a qual pode persistir por vários anos, com produção de anticorpos, a baixos títulos, depois da cura da doença. Os títulos de anticorpos não estão necessariamente correlacionados com a proteção do hospedeiro, o que sugere que a imunidade humoral não protege contra a infecção por *E. histolytica* (PÉREZ; KRETSCHMER, 1994; MANRIQUE *et al.*, 2002).

Por outro lado, a resposta imune celular tem sido demonstrada como fundamental para o controle da infecção, como mostram estudos de transferência passiva de células T e experimentos de imunossupressão seletiva. Verificou-se a presença de quadro clínico grave, com invasão de tecidos em animais de laboratório, quando suprimida a imunidade celular (WANG; KELLER; CHADEE, 1992; PÉREZ; KRETSCHMER, 1994).

Existem evidências que as amebas são destruídas *in vitro* por linfócitos T obtidos de pacientes curados de abscessos hepáticos amebianos, sendo as células CD8+ responsáveis pela lise do parasito. Para exercer sua atividade amebicida, os linfócitos requerem não apenas o contato célula a célula, mas também a ação de



certas citocinas como a IL-2 (interleucina 2) e o INF- $\gamma$  (interferon-gama) (SCHAIN; SALATA; RAVDIN, 1992).

*E. histolytica* induz intensa resposta inflamatória na mucosa intestinal. As células epiteliais iniciam uma resposta de defesa produzindo citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-8, fatores quimiotáticos para macrófagos e neutrófilos, induz produção de óxido nítrico e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (ANKRI, 2002).

Durante a lise celular mediada pelo contato ameba/célula há uma potente ação quimiotática para neutrófilos, que ao chegarem ao local da inflamação podem ser destruídos pelas amebas virulentas (RAVDIN; MURPHY, 1992; MANRIQUE *et al.*, 2002).

Investigando fatores moleculares envolvidos com a amebíase, Blazquez *et al.* (2006) mostraram um importante papel de TNF- $\alpha$  *in vitro*, atuando como agente quimiotático para os trofozoítos, ou seja, atraindo trofozoítos para o local onde há essa citocina.

Estudo recente mostrou que a expressão da enzima inflamatória cicloxigenase 2 (COX-2) em trofozoítos e macrófagos é importante para a formação do “abscesso” hepático amebiano, sugerindo que além de macrófagos e neutrófilos, os próprios trofozoítos poderiam estar envolvidos no processo inflamatório relacionado à amebíase extra-intestinal (GUTIERREZ-ALARCON *et al.*, 2006).

MLIF (fator de inibição da locomoção dos monócitos) foi identificado como um peptídeo produzido por *E. histolytica*, capaz de inibir a locomoção dos fagócitos mononucleares humanos e a produção de radicais livres por eles, facilitando a invasão das amebas (RICO *et al.*, 1992; KRETSCHMER; GIMENEZ, 2001).

Posteriormente, um estudo semelhante mostrou que *E. dispar* em culturas

axênicas não apresenta o fator de inibição da locomoção dos monócitos, e, conseqüentemente, isso poderia facilitar a sua eliminação pelos leucócitos (SILVA-GARCIA, *et al.*, 2003).

Stanley-Jr (2003) propôs um modelo de indução de inflamação, bem como, de danos teciduais, na colite amebiana. Algumas etapas foram destacadas:

- Aderência dos trofozoítos às células do epitélio intestinal (Gal/GalNAc);
- Ativação do programa de virulência (amebaporos e cisteína proteinases);
- Danos celulares e liberação do precursor da IL-1 $\beta$ ;
- IL-1 $\beta$  é clivada por cisteínas proteinases das amebas;
- IL-1 $\beta$  ativa o Fator Nuclear Kappa Beta (NF- $\kappa$ B) causando liberação de mediadores inflamatórios como IL-8 e COX-2;
- Neutrófilos são atraídos pelas substâncias quimiotáticas;
- Macrófagos liberam TNF $\alpha$ ;
- Substâncias liberadas por leucócitos e amebas causam lesões teciduais (cisteína-proteinases, outras enzimas e radicais livres);
- Amebas invadem o tecido.

Há evidências de que a imunidade inata é fundamental na resolução da colite amebiana, visto que, os pacientes que receberam doses altas de corticosteróides, potentes inibidores do NF- $\kappa$ B, apresentaram doença mais grave (STANLEY-JR, 2003).

A importância da resposta imune inespecífica também fica evidente através de um estudo recente realizado *in vivo*. Demonstrou-se que o estabelecimento de uma resposta inflamatória induzida, por exemplo, com bacilos Calmette-Guérin e

lipopolissacarídeo, protegeu os animais desafiados de desenvolver amebíase invasiva (SHIBAYAMA *et al.*, 2008).

Entretanto é importante enfatizar que a infecção pode ser agravada por respostas imunes exageradas por parte do hospedeiro, elementos como os radicais livres provenientes de leucócitos ativados podem contribuir para a formação de lesões (STANLEY-JR, 2003; SANTI-ROCCA *et al.*, 2009).

#### **1.1.4. Manifestações clínicas**

Estima-se que cerca de 90% dos casos de amebíase são assintomáticos. Porém, considerando as formas sintomáticas, a amebíase intestinal é a mais freqüente (STANLEY-JR, 2003).

Há a colite não disentérica, em que o paciente apresenta cólicas abdominais e períodos de diarreia intercalados por períodos assintomáticos, com funcionamento normal do intestino. Algumas vezes a colite é disentérica, caracterizada por sintomas dispépticos exacerbados (dor, eructação, queimação, náusea), distensão abdominal, flatulência, cólica, mais de dez evacuações muco-sanguinolentas por dia e sensação constante de necessidade de evacuar. A submucosa fica repleta de úlceras que podem causar distúrbios hidroeletrolíticos e desnutrição energético-proteica (MELO *et al.*, 2004).

Na amebíase extra-intestinal, os trofozoítos podem migrar através da veia mesentérica superior e chegar ao fígado, onde geram inflamação, degeneração celular e necrose liquefativa, formando assim o “abscesso amebiano”, geralmente no lobo direito. O paciente apresenta febre, dor intensa no hipocôndrio direito com irradiações típicas de cólica biliar e hepatomegalia dolorosa à palpação, geralmente não ictérica (THOMPSON; FORLENZA; VERMA, 1985).

A manifestação extra-intestinal mais comum é no fígado. Essa evolução no passado era considerada invariavelmente fatal, mas com a introdução de diagnóstico e tratamento mais efetivo, as taxas de mortalidade foram reduzidas para 1-3% (THOMPSON; FORLENZA; VERMA, 1985; BARNES *et al.*, 1987).

A amebíase pode ser agravada com infecção bacteriana secundária, podendo levar a ruptura do abscesso para a cavidade abdominal, para o pulmão, para a pleura ou para o pericárdio. A disseminação hematogênica do trofozoíto pode levar a formação de lesões no pulmão, pele, pericárdio, aparelho geniturinário e cérebro (STANLEY-JR, 2003).

Um estudo realizado no Vietnã reportou 21 casos de amebíase hepática para cada cem mil habitantes da cidade de Hue (BLESSMANN *et al.*, 2002). As lesões hepáticas parecem ser mais incidentes em pacientes portadores de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) como relatado em estudo realizado no Hospital Nacional de Seul, onde 32% dos pacientes com lesões hepáticas amebianas eram HIV positivos (MUZAFFAR *et al.*, 2006).

Papavramidis *et al.* (2008) relatou um caso de abdômen agudo devido a ruptura de um abscesso amebiano no fígado de grande dimensão, uma forma grave e com altas taxas de mortalidade. Os autores enfatizaram que o diagnóstico e o tratamento precisam ser rápidos para preservar a vida do paciente.

Uma importante forma da doença é a colite amebiana fulminante que, é mais freqüente em mulheres grávidas e indivíduos imunossuprimidos, além disso, associações com diabetes e uso de álcool têm sido também reportadas (TAKAHASHI, 1997; STANLEY-JR, 2003; SUÁREZ-ARTACHO *et al.*, 2006).

### 1.1.5. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico laboratorial da amebíase intestinal é feito tradicionalmente por pesquisa do parasito nas fezes. Em geral, formas císticas são encontradas em fezes consistentes e trofozoíticas em material fecal diarréico ou pastoso. Contudo, a inexperiência técnica, a eliminação intermitente do cisto de *E. histolytica/E. dispar* (WALSH, 1986) e a não diferenciação morfológica com outras amebas intestinais, células e artefatos podem promover erros no diagnóstico microscópico (BRUCKER, 1992).

No imunodiagnóstico, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos específicos contra o parasito no soro do paciente e o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de coproantígenos nas fezes têm sido empregados como alternativa diagnóstica. Ambas as técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de casos isolados ou para estudos epidemiológicos (HAQUE *et al.*, 1998), mostrando superior especificidade e sensibilidade no diagnóstico em relação à microscopia (KATZWINKEL- WLADARSCH *et al.*, 1994). A reação em cadeia da polimerase é considerada método de maior especificidade para a identificação de infecções por *E. histolytica*, constituindo método promissor para utilização rotineira em laboratórios, mas ainda está em fase de otimização para facilitar sua execução e reduzir custos (SILVA; GOMES, 2005).

Quanto ao tratamento, o metronidazol é o amebicida mais usado no mundo. É bem tolerado, sendo hoje praticamente a droga de escolha tanto na amebíase intestinal quanto na hepática, nas doses de 500-800 mg, três vezes ao dia, durante cinco dias. Quando os resultados não são satisfatórios, recomenda-se a associá-lo à antibióticos. Além do tratamento medicamentoso, a adoção de medidas profiláticas é fundamental, para impedir a contaminação fecal da água e alimentos, através de

medidas de saneamento básico, educação sanitária e rígido controle dos indivíduos que manipulam alimentos, muitas vezes portadores assintomáticos da amebíase (SILVA; GOMES, 2005).

## 1.2. Leucócitos e Estresse Oxidativo

O sistema hematopoiético é constituído de diversas células derivadas das células-tronco pluripotentes na medula óssea. As hemácias são as mais abundantes, são desprovidas de núcleo e organelas, contêm hemoglobina, executam funções vitais no organismo: transporte de gases e tamponamento dos íons de hidrogênio. Os leucócitos, nomenclatura usada para denominar vários tipos celulares, são importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas (PORTH, 2004).

Os linfócitos T e B são distinguidos pelos seus sítios de diferenciação, as células T no timo, e as células B, na medula óssea, bem como, por seus receptores de antígenos. Os linfócitos B, quando ativados, se tornam plasmócitos, secretores de anticorpos. As células T se subdividem em citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+). Os leucócitos que se originam de células-tronco mielóides são os monócitos, basófilos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (JANEWAY *et al.*, 2000).

Os eosinófilos e mastócitos são importantes nos casos de infecções parasitárias e abundantes na hipersensibilidade imediata. Os basófilos têm função semelhante e complementar aos eosinófilos e mastócitos. Os monócitos se diferenciam em macrófagos nos tecidos, onde são as principais células fagocitárias do sistema imunológico. Os neutrófilos são também fagócitos importantes, permanecem no sangue até serem recrutados para os locais de inflamação (JANEWAY *et al.*, 2000).

As células vivas têm a capacidade de englobar partículas através de um processo ativo que envolve a formação de prolongamentos da membrana plasmática e vesícula citoplasmática contendo o material englobado. Tal processo é genericamente denominado endocitose, que é dividido em fagocitose (partículas sólidas) e pinocitose (partículas líquidas). A fagocitose é um dos principais mecanismos inatos de eliminação de patógenos, constituindo uma das primeiras linhas de defesa contra infecções. O processo inicia-se pela adesão do fagócito ao agente lesivo, em seguida há o englobamento, através da formação de prolongamentos citoplasmáticos, forma-se o fagossoma e o fagolisossoma, e ao final do processo, teoricamente, há a morte do patógeno (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A destruição de microrganismos após a fagocitose pode ser mediada por dois mecanismos: metabolismo oxidativo com produção de metabólitos do oxigênio (BABIOR, 1978; MUNDI *et al.*, 1991) ou liberação de enzimas lisossômicas (SEGAL; SOOTHILL, 1983). A produção de reativos do oxigênio durante a fagocitose exerce importante atividade microbicida (MUNDI *et al.*, 1991; HONÓRIO-FRANÇA *et al.*, 2001).

Guerrant *et al.* (1981) estudaram a interação entre *E. histolytica* e fagócitos polimorfonucleares (PMN). Os estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que trofozoítos de cepas de *E. histolytica* menos virulentas eram circundadas por PMNs que as fragmentavam e ingeriam, o que não ocorria com amebas virulentas, que eram capazes de internalizar e matar PMNs.

Vinayak, Saxena e Joshi (1990) avaliaram as interações entre macrófagos peritoniais e trofozoítos de uma cepa virulenta de *E. histolytica* (NIH:200). Notaram

que em presença de anticorpos, os trofozoítos eram destruídos pelos macrófagos quando opsonizados.

Ghadirian e Denis (1992) analisaram o papel da citocina IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos, *in vitro*, para matar trofozoítos de *E. histolytica*. A atividade amebicida foi determinada após a incubação de macrófagos com trofozoítos de uma cepa virulenta de *E. histolytica* (IP:0682:1) por quatro horas, com posterior contagem do número de trofozoítos mortos. Houve aumento significativo na morte das amebas com o tratamento com IFN- $\gamma$ .

Estudos demonstraram um importante papel também do óxido nítrico na morte de amebas mediada pela ação de macrófagos, sendo que o parasito, para sobreviver, necessita evadir desse mecanismo imune. Para tanto, há relatos da sua capacidade de inibir a síntese e de catabolizar o óxido nítrico (LIN *et al.*, 1992; SEYDEL *et al.*, 2000, ANKRI, 2002).

O oxigênio molecular é indispensável à vida da maioria dos organismos. Entretanto, considerando as características químicas e as vias metabólicas de sua utilização, podem ocorrer algumas reações que resultam em efeitos deletérios a própria vida. Este aspecto deletério não é devido propriamente ao oxigênio molecular, pois este tem baixa reatividade e não é o causador direto de lesões oxidativas. Entretanto, os produtos intermediários de seu metabolismo, conhecidos como espécies reativas do oxigênio, estão envolvidos em diversos tipos de eventos oxidativos nas células, ocasionando a oxidação de estruturas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1996).

Durante o processo de oxidação celular, grande parte do oxigênio consumido é reduzido à água, mas cerca de 2 a 5% deste oxigênio pode sofrer redução



univalente seqüencial e formar ânions superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ) (ALESSIO, 1993).

Um radical livre é definido como qualquer espécie química que apresenta um ou mais elétrons não pareados, isto é, um elétron que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1996).

A idéia de que o oxigênio pode formar radicais livres e ter efeito tóxico é bastante antiga. Por volta de 1960 se propôs que os organismos vivos também produzam radicais livres endógenos, uma vez que estes apresentam um complexo enzimático capaz de eliminar ânions superóxidos, chamado de enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (FRIDOVICH, 1995).

O radical superóxido ( $O_2^-$ ) é formado após a primeira redução do  $O_2$ . Ele é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de não ser considerado muito reativo em soluções aquosas, havendo produção excessiva desse radical, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de  $O_2^-$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

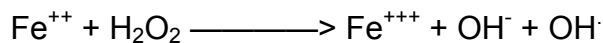
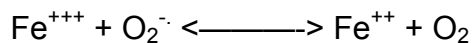
O radical hidroperoxila ( $HO_2^\bullet$ ) representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

O radical hidroxila ( $OH^-$ ) é muito reativo em sistemas biológicos. A sua combinação extremamente rápida com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, se o hidroxila for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas a

pontes dissulfeto. Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

Segundo Eaton (1991) o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio deletério, porque participa da reação que produz o OH<sup>-</sup>. A alta toxicidade está relacionada a lipoperoxidação de membranas, especialmente quando associado ao ferro, via reação de Haber-Weiss.

Reação de Haber-Weiss:



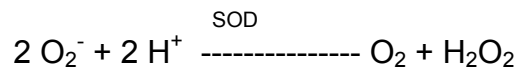
Os radicais livres podem atacar todas as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídeos os mais suscetíveis. Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares são rapidamente afetados por radicais oxidantes. A peroxidação lipídica, é bastante lesiva por consistir reação de auto-propagação na membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

O sistema de defesa antioxidante do organismo tem como principal função inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Existe uma grande variedade de substâncias antioxidantes, as quais podem ser classificadas em função da origem e/ou localização, em antioxidantes provenientes da dieta e antioxidantes intra e extracelulares. O mecanismo de ação permite ainda classificá-los como antioxidantes de prevenção (impedem a formação de radicais livres), varredores (impedem o ataque de radicais livres às células) e de reparo

(favorecem a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas) (JACOB, 1985).

A SOD tem sido relatada como importante mecanismo antioxidante, presente nos organismos eucariontes e procariontes, aeróbios estritos e microaerófilos. Essa enzima requer um metal como cofator para sua atividade funcional, podendo ser o cobre (Cu-SOD), o manganês (Mn-SOD) ou o ferro (Fe-SOD) (FRIDOVICH, 1995).

Essa enzima atua catalisando a dismutação do ânion superóxido. A dismutação é uma reação na qual duas moléculas idênticas são transformadas em compostos diferentes. No caso da SOD, um íon superóxido oxida o outro, gerando O<sub>2</sub> (normal) e água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A água oxigenada pode ser posteriormente degradada pela catalase ou peroxidase (YU, 1994).



*Entamoeba* e outros protozoários são considerados anaeróbios porque só crescem *in vitro* sob condições de tensão de oxigênio reduzida, sendo suscetíveis às espécies reativas do oxigênio. Porém, estes parasitos têm sido relatados como aerotolerantes, indicando a existência de mecanismos eficazes de desintoxicação (MEHLOTTRA, 1996).

*E. histolytica* tem sido descrita como microrganismo de metabolismo anaeróbico, obtendo energia por degradação de carboidratos via glicólise. Entretanto, há relatos de que mesmo sem ter mitocôndria e ciclo de Krebs, está presente uma cadeia respiratória incompleta, com um complexo (Fe-S)-proteína ao invés de citocromo (WEINBACH, 1980).

Uma organela homóloga à mitocôndria, denominada “Cryton/Mitosome” foi identificada em *E. histolytica*, e sugerida sua origem de um ancestral comum com a mitocôndria (CHAN, 2005).

Durante a invasão, os trofozoítos de *E. histolytica* são expostos a quantidades elevadas de espécies reativas do oxigênio, tais como o radical superóxido. A alta toxicidade dessas moléculas causa vários danos para as macromoléculas biológicas, levando a danos metabólicos. Para sobreviver a esse ambiente, o parasito tem que ser capaz de inativar os radicais livres (MURRAY; ALEY; SCOTT, 1981; CLARK; HUNT; COWDEN, 1986).

Chen *et al.* (1996) procurando identificar mecanismos antioxidantes em *E. histolytica*, encontraram as enzimas SOD e catalase. Os autores enfatizaram que elas seriam mecanismos preventivos frente ao metabolismo aeróbico e seus produtos tóxicos, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, substâncias que poderiam ser letais para as amebas.

Lo e Reeves (1980) reportaram a purificação da enzima NADPH:flavina oxidoreductase em lisados de *E. histolytica*. O parasito produz a Fe-SOD (SOD associada ao ferro), que é induzida pelo ânion superóxido, há produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que pode ser detoxificada também pela NADPH:flavina oxidoreductase (BRUCHHAUS; RICHTER; TANNICH, 1998).

Estudos mostraram que a SOD e a enzima de superfície EH29 (peroxidase tiol-dependente) aumentam significativamente quando os trofozoítos são expostos a altos níveis de oxigênio, sugerindo que ambas estão envolvidas na sobrevivência do parasito ao estresse oxidativo (ANKRI, 2002; AKBAR *et al.*, 2004; SEN *et al.*, 2007).

Wassmann *et al.* (1999) avaliaram a resistência de *E. histolytica* ao metronidazol e puderam detectar que isso tinha correlação com mudanças enzimáticas, sendo que, a expressão da SOD estava aumentada nas amebas resistentes.

### 1.3. Melatonina (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hormônios podem modular respostas imunológicas, algumas vezes estimulando-as, podendo, porém, em determinadas circunstâncias atuarem como reguladores, inibindo algumas respostas. Dentre os hormônios que podem interferir nas respostas imunológicas, a melatonina é freqüentemente relatada (PIERPAOLI; MAESTRONE, 1987; BLALOCK, 1994; FRANÇA, 1997; KUHLEIN; IRWIN, 2001; FRANÇA, 2002; DZERZHYSKY; GORELIKOVA; PUSTOVALOV, 2006).

A melatonina foi isolada e caracterizada como um hormônio produzido pela glândula pineal no final da década de 50 (LERNER *et al.*, 1959). A partir daí, vários estudos avaliaram as funções da melatonina, que surpreendentemente, parece agir em vários sistemas fisiológicos.

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), primeiro composto biologicamente ativo identificado na glândula pineal, é uma indolamina, produto do metabolismo da serotonina. É um hormônio produzido por um número limitado de órgãos nos mamíferos, incluindo a glândula pineal, e, secundariamente, a retina, trato gastrintestinal e células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos. Sua síntese é controlada pelo núcleo supraquiasmático, situado no hipotálamo, que constitui o relógio biológico mestre no organismo dos mamíferos (MASANA; DUBOCOVICH, 2001).

Durante o dia, a síntese de melatonina, bem como, o fluxo da atividade simpática está reduzido. Fibras nervosas da retina captam a luminosidade do ambiente e transmitem essa informação para o núcleo supraquiasmático. No momento em que escurece, ocorre a ativação simpática e liberação de noradrenalina que, através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos pinealócitos, ativa a proteína cinase A, que aumenta a síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Este, por sua

vez, ativa a N-acetiltransferase (NAT) que catalisa a conversão de serotonina em melatonina (REITER, 1991).

A glândula pineal é um órgão minúsculo, com formato de pinha, daí seu nome, pesando de 100 a 180 mg, está localizada na área central do cérebro, na fissura formada pelo encontro do cerebelo e dos hemisférios cerebrais. Apesar de poder ser extraídas da pineal, outras substâncias, como a dopamina e serotonina, a única substância em quantidade suficiente para exercer funções biológicas secretada por essa glândula, é a melatonina (CRAPO, 1985).

A concentração de melatonina no sangue em indivíduos normais é muito baixa durante a maior parte do dia, mas aumenta significativamente, para a média de 80 a 100 pg/ml, entre 2 e 4 horas da manhã e permanece elevada durante o tempo normal do sono, caindo abruptamente por volta das 9 horas da manhã. O aumento noturno da melatonina sérica parece estar relacionado aos seus efeitos agudos, como a alteração da termorregulação, liberação de neurotransmissores encefálicos, estimulação da secreção de prolactina e indução do sono (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988).

Estudos mostraram que a melatonina pode ser encontrada no sangue, no líquido e na urina (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988; ZAIDAN *et al.*, 1994). Há também relato de melatonina no leite humano (FRANÇA, 2002; PONTES *et al.*, 2006).

A regulação do sono é considerada a principal função da melatonina, entretanto não é a única. Estudos têm demonstrado uma ampla versatilidade funcional, especialmente a existência de diferentes efeitos imunomoduladores. Outras funções também já foram descritas como: atuar como antioxidante (REITER, 1998; KORKMAZ *et al.*, 2008; ILBEY *et al.*, 2009), ação oncostática (COS, 1998;

SRINIVASAN *et al.*, 2008) e retardo do envelhecimento (REITER, 1992; CABALLERO *et al.*, 2009).

O primeiro relato do uso da melatonina exógena em humanos é o de Lerner *et al.* (1960), que a injetaram 200mg por via endovenosa em um voluntário, obtendo como efeito, uma leve sedação. Anton-Tay *et al.* (1971) testaram várias doses (0,5 mg/kg a 1,25 mg/kg por via oral) em voluntários sadios, epiléticos e parkinsonianos. Tal estudo demonstrou a indução de sono, que ocorreu cerca de 15 a 20 minutos após a administração de melatonina em indivíduos normais e epiléticos. Nos pacientes epiléticos ocorreu também aumento do limiar convulsivo; já os pacientes parkinsonianos apresentaram melhora significativa em vários testes de desempenho, devido à diminuição da rigidez e do tremor ao longo do tratamento.

Devido à sua potente ação indutora de sono a melatonina tem sido utilizada na terapêutica das perturbações do sono, principalmente nas insônias (JAMES *et al.*, 1990; MACFARLANE *et al.*, 1991), nos transtornos decorrentes da mudança de fuso horário (ARENDR, 1987) e nos trabalhadores com jornada noturna (WEITZMAN *et al.*, 1981).

Há evidências bioquímicas de que os receptores da melatonina são heterogêneos e podem ser classificados em subtipos. Ensaio com rádio-receptores e radioautografia *in vitro*, utilizando um agonista da melatonina (2-[125I]iodomelatonina), identificaram receptores de alta afinidade na maioria dos vertebrados, inclusive o homem. Na maior parte dos mamíferos, os receptores para melatonina de alta afinidade são encontrados no sistema nervoso central, sendo provável que eles mediem os efeitos circadianos da melatonina. Já foram encontrados receptores na área pré-óptica, córtex cerebral e tálamo. Os receptores encontrados na retina e colículo superior estão implicados na regulação da função

visual. Também já foram encontrados receptores de alta afinidade na hipófise, em local envolvido na regulação fotoperiódica da prolactina (REPPERT; WEAVER, 1995).

Estudos de afinidade de diversos análogos de melatonina indicaram que os grupos 5-metoxi e N-acetil são necessários para a interação do hormônio ao seu receptor. Com a introdução do composto (2-I<sup>125</sup>)-melatonina como marcador dos sítios ligantes, através de métodos bioquímicos e auto-radiográficos, foram identificados os receptores MT-1, MT-2 e MT-3, com especificidade para a melatonina e N-acetilserotonina (VANECEK, 1998).

Hormônios da tireóide (T3 – triiodotironina e T4 - tetraiodotironina) também ativam elementos imunológicos, como células NK (*natural killer*) e macrófagos. Por outro lado, o sistema imune também pode interferir na tireóide, há indícios que ele pode ativar a glândula, mas apenas em presença de determinados níveis de melatonina (DZERZHYSKY; GORELIKOVA; PUSTOVALOV, 2006).

Experimentos têm sugerido que a glândula pineal tem uma ação anti-tumoral. A melatonina estimula a defesa anti-câncer durante à noite, correspondendo ao período onde seus níveis são máximos no sangue (LISSONI *et al.*, 1996).

Em relação ao câncer de mama, um estudo recente pôde concluir que a melatonina tem ação protetora. Foi observado redução da concentração urinária de metabólitos da melatonina em mulheres pós-menopáusicas que desenvolverem esse tipo de câncer (SCHERNHAMMER; HANKINSON, 2009).

A melatonina tem propriedade imunomoduladoras e é também produzida por células imunocompetentes. Há evidência de 'feedback' da atividade do sistema imune na glândula pineal. Para facilitar a imunomodulação durante as injúrias



teciduais, a produção de melatonina pode ser também proveniente de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares (PONTES *et al.*, 2006).

Há relatos a respeito do envolvimento de receptores para o hormônio melatonina em fagócitos e aventa-se a hipótese de ações deste hormônio na ativação celular (LIEBMANN *et al.*, 1997; VANECEK, 1998; CARDINALI *et al.*, 2008).

Por outro lado, a melatonina também é relatada como agente antiinflamatório, contribuindo para a eliminação de radicais livres e regulando a síntese da cicloxigenase 2 (COX-2). A inflamação é fenômeno complexo que envolve múltiplas interações celulares e moleculares, as quais têm que ser bem reguladas para que a resposta seja eficiente e não acarrete prejuízos para os tecidos do hospedeiro. A COX-2 é uma enzima chave para a biosíntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico, ela tem um papel crítico na resposta inflamatória, e sua expressão excessiva está associada ao agravamento de várias doenças (MAYO *et al.*, 2005).

De la Rocha *et al.* (2007) mostraram que a melatonina tem estrutura semelhante a COX-2 e por isso pode se ligar ao seu sitio ativo, atuando como um inibidor natural das funções dessa enzima, modulando de maneira natural a sua atividade.

Há ainda muita controvérsia quanto à ação da melatonina na resposta imune, muitas vezes descrita por sua habilidade antioxidante, contraditoriamente, a melatonina também é relatada como pró-oxidante (RADOGNA *et al.*, 1997). Há estudos que mostram a melatonina ativando as células T auxiliares para aumentar a produção de de IL-2 e ativando os monócitos a produzirem IL-1, IL-6, TNF, e radicais livres. Há também produção de IL-12 pelos monócitos com diferenciação para uma resposta imune do tipo Th1 (MORREY *et al.*, 1994; GARCÍA-AURIÑO *et al.*, 1997).

França (2002) avaliou a participação do receptor de melatonina nos mecanismos de ativação de fagócitos do sangue e do colostro. Foi utilizado o antagonista do receptor que é o luzindol e o agonista denominado McA-NAT. Os resultados indicaram que o bloqueio do receptor diminuiu a atividade fagocítica e a presença de McA-NAT resultou em aumento de fagocitose, bem como de atividade microbicida para *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

Ben-Nathan *et al.* (1995) examinaram o efeito da melatonina como agente de proteção, gerando ativação imunológica em casos de encefalite viral. A injeção de melatonina foi capaz de reduzir a mortalidade de camundongos infectados de 100% para 44%.

A melatonina pode inibir precocemente a progressão do ciclo de desenvolvimento de clamídias, possivelmente por um mecanismo que envolve os receptores da proteína G, podendo ser útil para prevenção dos danos decorrentes dessa infecção (RAHMAN *et al.*, 2005).

A secreção noturna de melatonina em indivíduos com infecção assintomática por *Helicobacter pylori* é significativamente maior que em indivíduos com infecção sintomática, que apresentam dispepsia e úlceras duodenais. A reduzida secreção noturna desse hormônio no grupo de sintomáticos indica que provavelmente há uma relação com a patogênese da doença (KLUPINSKA *et al.*, 2006).

Reiter e Korkmaz (2008) realizaram uma revisão quanto aos aspectos clínicos da melatonina e destacaram que ela é altamente eficaz na eliminação de radicais livres, apresentando importante ação antioxidante. Nesta capacidade, a melatonina reduz a cataratogênese experimental, a lesão traumática da medula espinhal e cérebro, protege contra danos oxidativos nos neurônios, em modelos de acidente vascular cerebral, parkinsonismo, e doença de Alzheimer. Além disso, a melatonina

e seus metabólitos são altamente eficazes na proteção contra as radiações ionizantes. Pode ainda ser útil para regular a pressão arterial, atuando como tratamento complementar para pacientes hipertensos.

Na esquistossomose, o processo oxidativo que ocorre no local da inflamação gera efeitos destrutivos para os tecidos, indicando que os radicais livres são componentes centrais da doença. Um estudo avaliou a melatonina como imunomodulador das alterações histopatológicas relacionadas à esquistossomose, evidenciando que a ação antioxidante da melatonina é altamente protetora, quando administrada após a infecção por *Schistosoma mansoni*, sendo capaz de reduzir danos como a formação de granulomas no fígado (EL-SOKKARY *et al.*, 2002).

Pouco é conhecido quanto a ação imunomoduladora da melatonina em infecções causadas por protozoários. Os escassos estudos publicados avaliaram interferências em casos de toxoplasmose (BALTACI *et al.*, 2003; BALTACI *et al.*, 2004; BALTACI *et al.*, 2005). Considerando os percentuais de linfócitos CD4+ e CD8+, a deficiência de melatonina, gerada pela remoção da glândula pineal de alguns animais, teve influência negativa na resposta imune dos ratos com toxoplasmose (BALTACI *et al.*, 2005). A associação melatonina e zinco foi capaz de melhorar a resposta imune em ratos com retinocoroidite, podendo ser utilizada como um adjuvante terapêutico (AVUNDUK, 2007).

Só recentemente outros pesquisadores começaram a questionar o possível papel desse hormônio em outras parasitoses e aventar perspectivas terapêuticas. A melatonina pode ser útil no tratamento da Doença de Chagas. Ratos tratados com melatonina exógena tiveram uma significativa redução do número de tripomastígotas durante a fase aguda da infecção e os cortes histológicos do coração mostraram

redução do parasitismo e do infiltrado inflamatório (SANTELLO *et al.*, 2007; SANTELLO *et al.*, 2008).

Em relação à malária, alguns estudos também foram realizados. Hotta *et al.* (2003) destaca que a duração do ciclo intra eritrocítico do *Plasmodium* é fator chave na patogenicidade destes parasitos e depende da sincronicidade propiciada pela melatonina. Os autores atentam para a necessidade de investigar os mecanismos envolvidos nessa sincronicidade, só assim será possível o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a malária. Há relato que um produto do metabolismo da melatonina (*N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine*) modula o ciclo celular dos parasitos, especialmente nas formas eritrocíticas de trofozoíto e esquizonte (BUDU *et al.*, 2007).

Os relatos anteriores mostrando um forte papel modulador da melatonina e o fato de não haver descrição de sua possível interferência em caso de amebíase instigaram a realização do presente estudo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

Avaliar a influência da melatonina nas interações entre células sanguíneas e trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**2.2.1.** Verificar a capacidade de eritrofagocitose e leucofagocitose de trofozoítos de uma cepa virulenta e outra avirulenta de *E. histolytica*.

**2.2.2.** Verificar a capacidade de eritrofagocitose e leucofagocitose de trofozoítos de *E. dispar*.

**2.2.3.** Avaliar o estresse oxidativo durante interações entre leucócitos e trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, através da dosagem do ânion superóxido.

**2.2.4.** Avaliar os níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) durante interações entre leucócitos e trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*.

**2.2.5.** Avaliar a influência da melatonina na eritrofagocitose, leucofagocitose, liberação do superóxido e SOD.

**2.2.6.** Avaliar a influência da melatonina na formação de lesões hepáticas amebianas em hamsters.

### 3. JUSTIFICATIVA

Trofozoítos de *E. histolytica* exibem extraordinária capacidade fagocítica, a qual pode ser relacionada a sua virulência para fins de caracterização dos diferentes isolados. Entretanto, a maioria dos estudos utilizando esta habilidade para caracterizar os isolados foi realizada apenas com eritrócitos ou bactérias (TRISSEL *et al.*, 1978; GUERRANT *et al.*, 1981; GOMES *et al.*, 1995; VOIGT *et al.*, 1999; BATISTA; SOUZA, 2004; BOETTNER *et al.*, 2005), sendo pouco conhecido sobre as interações amebas e leucócitos. Quanto à *E. dispar*, a literatura é ainda mais escassa, e, comparações entre as duas espécies, quanto à leucofagocitose, ainda não foram descritas. O estudo da interação ameba-leucócito pode contribuir para confirmar funções patogênicas conhecidas e apresentar novas possibilidades para o sucesso da ameba em vencer as barreiras do hospedeiro e estabelecer a doença.

Dentre as funções microbicidas presente em células fagocíticas encontra-se a habilidade para induzir *burst* oxidativo, exigindo que as células sujeitas às agressões geradas pelos radicais livres tenham eficazes mecanismos desintoxicantes. Neste contexto, a dosagem do ânion superóxido e da enzima superóxido dismutase, complementar e incrementará a avaliação da leucofagocitose.

Considerando a importância da imunidade no controle das infecções e a influência dos hormônios nesta função, avaliamos a atividade de um promissor hormônio envolvido na modulação da resposta imune, a melatonina.

Há fortes indícios da ação moduladora desempenhada pela melatonina, entretanto, quanto a sua ação na interação entre protozoários e seus hospedeiros, os relatos são escassos. Há estudos com *Toxoplasma gondii* (BALTACI *et al.*, 2003; BALTACI *et al.*, 2004; BALTACI *et al.*, 2005; AVUNDUK, 2007); e recentemente Santello *et al.* (2007) mostrou que a melatonina pode ser útil no tratamento da

tripanossomíase e Budu *et al.* (2007) em relação à malária. Em relação às espécies do gênero *Entamoeba*, não se conhece qualquer ação da melatonina.

A demonstração da interferência da melatonina na interação ameba-leucócito abrirá possibilidade de uso da droga como adjuvante na terapia antiamebiana.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário do Planalto de Araxá (6815/41), local onde as coletas de sangue ocorreram. Todos os experimentos foram realizados dentro de normas de biossegurança e para cada tipo de ensaio *in vitro* foram realizadas 5 repetições.

### 4.1. Culturas de *E. histolytica* e *E. dispar* para testes *in vitro*

Os trofozoítos de *E. histolytica* foram mantidos em meio de cultura Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum (TYI-S-33) para cultivo axênico de acordo com Diamond, Harlow & Cunnick (1978); e para o cultivo monoxênico de *E. dispar* (ICB-ADO) foi utilizado o meio YI-S (DIAMOND; CLARK; CUNNICK, 1995). A monoxenização da cepa já previamente realizada por Costa *et al.*, (2006) utilizou *Crithidia fasciculata* ( $10^6$ /mL) como organismo associado (ATCC 1745) mantido em temperatura ambiente.

Os parasitos são mantidos no Laboratório de Amebíase da UFMG, com repiques três vezes por semana, garantindo a utilização dos mesmos em fase exponencial de crescimento. Foram avaliadas duas cepas de *E. histolytica*, a HM1-IMSS, que é virulenta, isolada por De la Torre *et al.* (1971) no México, de um paciente com colite disentérica. A cepa ICB-32 foi isolada no Brasil de um paciente assintomático (SILVA *et al.*, 1997) e a cepa ICB-ADO de *E. dispar* foi também isolada no Brasil de paciente apresentando colite não disentérica (COSTA *et al.*, 2006).



## 4.2. Obtenção de células do sangue periférico

Após assinarem termo de consentimento (Anexo 1) foram coletadas quinze amostras de sangue periférico de cinco adultos, sendo três de cada voluntário, em dias diferentes. Os voluntários eram do sexo masculino, com idade entre 18 e 40 anos, todos relataram em entrevista verbal terem consultado, na semana da coleta do sangue, um clínico geral não havendo nenhum processo patológico conhecido, nem história de amebíase. Todos apresentaram exame de fezes negativo e hemograma sem alterações.

Cada amostra foi composta por cerca de 15 mL de sangue em tubo heparinizado. As amostras foram separadas por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia, Upsala, Suécia), durante 40 minutos a 160 x g. Acima da camada de Ficoll-Paque, foi formado um anel de fagócitos mononucleares (MN) que foi retirado e separado em tubo com 8 mL de PBS (*phosphate buffered saline – pH 7,4*). O restante do sangue foi submetido à sedimentação por Dextran Sulfato de Sódio (Sigma - USA), durante 90 minutos, em estufa a 37°C, para separação das células polimorfonucleares (PMN). Após, os PMNs foram retirados e colocados em PBS. Parte do sedimento das amostras, rico em hemácias, foi também ressuspenso em PBS. Os tubos com os grupos celulares foram lavados duas vezes por centrifugação por 10 minutos a 160 x g. As suspensões de leucócitos foram ajustadas para  $2 \times 10^6$ /mL (contagem em câmara de Neubauer) e os experimentos seguintes (eritrofagocitose, leucofagocitose, dosagem do superóxido e de SOD) foram realizados imediatamente a essa separação (HONÓRIO, 1995).

### 4.3. Ensaio de eritrofagocitose

A eritrofagocitose *in vitro* foi realizada segundo adaptação do método de Trissl *et al.* (1978). Os trofozoítos foram ajustados para  $1 \times 10^6$ /mL em PBS, 0.4 mL desta suspensão foi deixado interagir com o mesmo volume de uma suspensão de  $1 \times 10^8$ /mL de eritrócitos, a taxa de ameba e eritrócito foi de 1:100. O tempo de interação foi de 20 minutos a 37°C, baseado nos experimentos de Gomes *et al.* (1997).

Os resultados foram expressos como o percentual de amebas que fagocitaram eritrócitos e no número de eritrócitos fagocitados por ameba na contagem de 100 amebas por lâmina.

### 4.4. Ensaio de leucofagocitose

As suspensões de células PMN e MN ( $2 \times 10^6$ /mL) foram misturadas com trofozoítos *E. histolytica* (taxa de ameba e leucócito de 1:2) e incubadas em banho-maria por uma hora, a 37°C com agitação para favorecer a interação. Em seguida, as células foram lavadas em PBS por centrifugação por 10 minutos a 160 x g e coradas com 200  $\mu$ l (14,4 g/L) de laranja de acridina durante dois minutos, e então, ressuspensas em PBS (pH 7,4) e lavadas por mais duas vezes (BELLINATI-PIRES *et al.*, 1989).

Em seguida foram realizados esfregaços com os sedimentos obtidos e assim que estavam secos, as lâminas foram imediatamente observadas em microscópio de fluorescência (TIM-4000, Alemanha), para a determinação dos índices de aderência e fagocitose (contagem de 100 amebas por lâmina). Sendo um fluorocromo metacromático, laranja de acridina permitiu a determinação dos índices de morte de leucócitos e amebas, através da contagem de 100 amebas fagocíticas. Quando a

coloração dos núcleos apresenta-se alaranjada indica danos no DNA, e então as células podem ser consideradas mortas; e uma coloração verde é indicativa de viabilidade celular (HILL; PEARSON, 1987).

#### 4.5. Dosagem do Ânion Superóxido ( $O_2^-$ )

Para avaliar o metabolismo oxidativo após os ensaios de fagocitose, através da liberação de ânion superóxido, foi usado o cromógeno Ferricitocromo C, segundo o método de Pick e Mizel (1981). Em presença do ânion superóxido, o ferricitocromo C sofre redução a ferrocitocromo C, sendo esta mudança colorimétrica, detectável em espectrofotômetro com filtro de 630nm.

As suspensões de PMN e MN ( $2 \times 10^6$ /mL) foram misturadas com trofozoítos *E. histolytica* (1:2) e incubadas a 37° C em banho-maria por uma hora com agitação. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 0,5 mL de PBS (pH 7,4) contendo  $CaCl_2$  (2,6 mM),  $MgCl_2$  (2,6 mM) e Ferricitocromo C (Sigma - USA) na concentração de 2mg/mL. Em seguida, as amostras foram colocadas em placas de 96 poços, com volume de 100  $\mu$ L por poço e colocadas em estufa a 37° C durante uma hora.

Como controle foi utilizado 10  $\mu$ L de *Phorbol 12-myristate-13-acetate* (PMA, Sigma - 1 $\mu$ g/mL) para estimular o *burst* oxidativo dos leucócitos. A leitura foi feita em espectrofotômetro para placa. Segundo Pick e Mizel (1981), a concentração do ânion superóxido pode ser calculada através da seguinte relação:

$$\text{Concentração } O_2^- \text{ (nmol)} = \frac{\text{Abs} \times 100}{6,3}$$

#### 4.6. Dosagem da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para determinar a concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizado o protocolo experimental adaptado de Crouch *et al.* (1981), baseado na habilidade da enzima inibir a redução do NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

Os leucócitos ( $2 \times 10^6$ /mL) juntamente com amebas (1:2) foram incubadas em banho-maria por uma hora com agitação a 37°C. Em seguida, as amostras (0,5 mL) foram colocadas em tubos de ensaio com 0,5 mL de clorofórmio-etanol e 0,5 mL de mistura reativa, composta por NBT (0,98 mg/mL) e 58,4 mg/L de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Foi também adicionado 2 mL de tampão carbonato (pH 10,2) acrescido com hidroxilamina (26 g/L). Uma amostra padrão foi composta de 0,5 mL de mistura hidro-alcoolica, acrescida de 0,5 mL de etanol, 0,5 mL de mistura reativa e 2 mL de tampão carbonato + hidroxilamina.

As amostras permaneceram em repouso durante 15 minutos e a seguir foi realizada leitura em espectrofotômetro na absorvância 560nm. Um tubo somente com mistura reativa (volume total de 3,5 mL) compôs o branco.

A concentração da SOD foi calculada através da seguinte relação:

$$\frac{\text{Abs padrão} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs padrão}} \times 100$$

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que diminui a velocidade inicial de redução do NBT em 50% dentro das condições do ensaio. Os resultados foram expressos em Unidade Internacional de SOD (UI).

#### 4.7. Modulação hormonal e delineamento das interações *in vitro*

A melatonina apresenta funções moduladoras para os leucócitos, assim avaliamos a ação desta droga quando da interação das amebas com leucócitos e eritrócitos. Além disso, como controle adicional, a cortisona também foi utilizada, por sua reconhecida ação imunomoduladora. A influência dos hormônios na eritrofagocitose, leucofagocitose, dosagem de  $O_2^-$  e de SOD seguiu a metodologia de França (2002). Foi adicionado a cada tubo de experimentação 100  $\mu$ L de melatonina ou de cortisona (Sigma – USA) antes da incubação das amebas com as células. O tempo de incubação foi de 20 minutos no ensaio de eritrofagocitose e nos demais ensaios foi de uma hora. Para evitar possíveis danos a melatonina, e, conseqüentemente, interferências nos resultados, o produto foi cuidadosamente protegido da luz durante os experimentos.

Quanto à formação dos grupos experimentais, os trofozoítos de cada cepa de *Entamoeba* foram colocados em tubos Falcon, esterilizados e previamente identificados, contendo tampão PBS (pH 7,4) juntamente com:

- a- eritrócitos
- b- leucócitos PMN
- c- leucócitos MN
- d- eritrócitos + melatonina
- e- leucócitos PMN + melatonina
- f- leucócitos MN + melatonina
- g- eritrócitos + cortisona
- h- leucócitos PMN + cortisona
- i- leucócitos MN + cortisona

Além dos grupos acima, a dosagem de  $O_2^-$  e SOD foi realizada também em trofozoítos, leucócitos MN e PMN, isoladamente, com e sem melatonina.

#### **4.8. Avaliação do efeito da melatonina em infecções experimentais em Hamsters**

O efeito da melatonina sobre a amebíase foi avaliado para o modelo de amebíase hepática produzido em hamsters. Este modelo foi escolhido por ser o hamsters o animal mais susceptível a infecção por *E. histolytica*. Critérios para determinar a gravidade das lesões já estão bem estabelecidos, possibilitando assim a determinação de diferenças antes e após a administração da droga.

##### **4.8.1. Infecção dos hamsters com *E. histolytica***

Hamsters machos de aproximadamente um mês de idade, pesando cerca 60g foram inoculados intra-hepaticamente com inóculos variando de  $1,5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  trofozoítos, das cepas axênicas HM1-IMSS e EGG de *E. histolytica*. A cepa HM1 foi isolada de caso de disenteria amebiana e a cepa EGG foi isolada de um caso de “abscesso” hepático amebiano. Ambas produzem severas lesões nos animais de experimentação.

Trofozoítos de culturas axênicas foram centrifugados a  $200 \times g$  nos próprios tubos, lavados duas vezes em PBS (pH 7,2) e ajustados para concentrações que variaram de  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^5$  amebas em 0,1 mL do inóculo.

Seis hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram utilizados para cada grupo de experimentação. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hipnol<sup>®</sup>), laparatomizados e a inoculação foi feita diretamente no lobo esquerdo do fígado.

Seis dias após a inoculação, os animais foram sacrificados e abertos para exame macroscópico do fígado. A incidência (número de animais com lesões contendo amebas pelo número de animais inoculados) e a gravidade das lesões foram determinadas e avaliadas, através de critérios baseados na classificação de Diamond *et al.* (1974), conforme descrito a seguir:

- **0** – Fígado normal, fibrose no local ou lesão bacteriana < 4 mm (ausência de amebas confirmada por cultivo do fragmento da lesão);
- **I** – Lesão no ponto de inoculação menor que 15 mm de diâmetro;
- **II** – Lesão maior que 15 mm, sem metástases;
- **III** – Lesão no lobo primário, algumas metástases para outras áreas;
- **IV** – Lesão extensa, com metástase, mínimo de 50% do fígado comprometido.

Um fragmento de cada lesão foi macerado em PBS (pH 7,2) entre lâmina e lamínula, para verificação microscópica da presença de trofozoítos. O lobo hepático que apresentava a lesão foi coletado e fixado em formol tamponado 10% pH 7,2. Os fragmentos foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina.

Foram obtidos cortes com 4 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). Todas as lâminas coradas foram utilizadas para avaliar a presença de lesões amebianas.

#### **4.8.2. Tratamento com melatonina**

Foram avaliadas três vias de administração da droga nos animais: oral, subcutânea e intraperitonal, com doses variando de 3mg/Kg a 50mg/Kg do animal como segue:

**4.8.2.1. Via oral** - Foram utilizadas três doses em três diferentes experimentos: 5, 15 e 50 mg/Kg do animal. As doses da melatonina foram ajustadas para um volume de 200 µL em água e administradas aos animais por uso de cânulas gástricas.

- Grupo 1: tratamento diário com melatonina sete dias antes da inoculação com *E. histolytica*, prosseguindo até o 6º dia do sacrifício, pós inoculação.
- Grupo 2: tratamento diário com melatonina a partir do dia da inoculação com *E. histolytica* até o 6º dia do sacrifício.
- Grupo 3: controle – animais inoculados com *E. histolytica*, sem tratamento com melatonina.

**4.8.2.2. Via intraperitoneal** - Foram utilizadas duas diferentes doses em três experimentos, 3 e 15 mg/Kg do animal. As doses da melatonina foram ajustadas para volumes de 100 µL em etanol 70% e administradas com equipo protegido de luz.

- Grupo 1: tratamento diário com melatonina sete dias antes da inoculação com *E. histolytica*, prosseguindo até o 6º dia do sacrifício, pós inoculação.
- Grupo 2: tratamento diário com melatonina a partir do dia da inoculação com *E. histolytica* até o 6º dia do sacrifício.
- Grupo 3: controle – animais inoculados com *E. histolytica*, sem tratamento com melatonina.

**4.8.2.2. Via subcutânea** - Foi usada a dose de 15 mg/Kg do animal ajustadas em etanol 70% e água.

- Grupo 1: tratamento diário com melatonina dissolvida em água no dia da inoculação com *E. histolytica* até o 6º dia do sacrifício.
- Grupo 2: tratamento diário com melatonina dissolvida em etanol 70% no dia da inoculação com *E. histolytica* até o 6º dia do sacrifício.



- Grupo 3: controle – animais inoculados com *E. histolytica*, sem tratamento com melatonina.

Todos os procedimentos de manipulação da melatonina ocorreram em sala escura.

#### **4.9. Análise estatística**

Com auxílio do programa GraphPad InStat (3.0 for Windows) foram realizadas análises de variância dos resultados dos testes *in vitro*, com os respectivos desdobramentos de interações entre fatores (ANOVA); e após verificar a significância, o teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias ao nível de 0.05 de probabilidade. As diferenças foram consideradas significativas quando seu “p value” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

Todos os resultados dos testes *in vitro* representam a média de cinco experimentos. Para facilitar à exposição dos resultados a cepa HM1-IMSS será mencionada apenas como HM1.

### 5.1. Eritrofagocitose

A tabela 1 mostra a capacidade eritrofagocítica de *E. histolytica* e *E. dispar*. Nota-se que ocorreu diferenças nos índices de eritrofagocitose, bem como, no número de eritrócitos internalizados, considerando as cepas analisadas. A HM1 obteve o maior índice de fagocitose (92%) e de eritrócitos internalizados (16 eritrócitos). A utilização dos hormônios melatonina e cortisona nas interações das amebas com os eritrócitos não interferiu de maneira significativa na capacidade de eritrofagocitose.

**Tabela 1:** Número de eritrócitos fagocitados e percentuais de amebas fagocíticas nas interações entre trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* com eritrócitos humanos, em presença e ausência de melatonina e cortisona.

		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>
		HM1	ICB-32	ICB-ADO
<b>NÚMERO DE ERITRÓCITOS FAGOCITADOS</b>	Hormônio (-)	16 ± 1,5 <sup>ab</sup>	3 ± 1,4 <sup>a</sup>	2 ± 1,2 <sup>b</sup>
	Melatonina (+)	18 ± 1,5	4 ± 0,7	2,4 ± 1,1
	Cortisona (+)	15 ± 2,2	3 ± 1,4	2 ± 0,7
<b>PERCENTUAL DE AMEBAS FAGOCÍTICAS</b>	Hormônio (-)	92 ± 2,9 <sup>ab</sup>	45 ± 3,6 <sup>ac</sup>	25,4 ± 2,0 <sup>bc</sup>
	Melatonina (+) %	89 ± 1,5	47 ± 1,4	26 ± 4
	Cortisona (+)	90 ± 2,5	44 ± 2,2	23,2 ± 2,7

Letras iguais em cada parâmetro avaliado indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

Incubação em PBS por 20 minutos a 37° C.

## 5.2. Leucofagocitose

A tabela 2 mostra a leucofagocitose realizada pelas cepas de *Entamoeba*, tendo como parâmetros: aderência, fagocitose, morte de leucócitos e morte de trofozoítos. O maior índice de aderência foi observado com MN + HM1 (63,4%), ICB-32 foi semelhante a HM1, mas, ICB-ADO mostrou índice significativamente menor (18,4%). A fagocitose de MN foi cerca de 50,6% para HM1, e menor para as outras cepas. A aderência e a fagocitose de PMN foram similares à MN.

Os índices de morte de leucócitos fagocitados por trofozoítos da cepa HM1 foram os mais altos: 40,4% e 31,2%, para MN e PMN respectivamente. As outras cepas tiveram menor capacidade de matar as células internalizadas. Observando-se as amebas fagocíticas, nota-se que trofozoítos de HM1 tiveram menores índices de morte, e ICB-ADO o maior, alcançando 76,2% em incubação com PMN (Tabela 2).

Os índices de aderência de trofozoítos de *E. histolytica* a PMN e MN, em presença ou ausência dos hormônios melatonina e cortisona são mostrados na tabela 3. Os dois hormônios aumentaram a aderência das amebas HM1 aos leucócitos MN e PMN, quando comparadas às incubações sem hormônios.

Os hormônios não interferiram na capacidade das amebas em internalizarem os leucócitos (Tabela 4) ou em determinar a morte de células sanguíneas (Tabela 5).

Entretanto, quanto às cepas HM1 e ICB-32 de *E. histolytica*, vale salientar que a melatonina aumentou o índice de amebas que morreram durante a internalização de leucócitos MN e PMN. Com cortisona, em geral os índices foram menores quando comparados à melatonina. Para a cepa ICB-ADO, os hormônios não tiveram papel modulador (Tabela 6).

**Tabela 2:** Leucofagocitose realizada por *E. histolytica* e *E. dispar* quanto aos parâmetros: aderência, internalização de leucócitos, leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) mortos e morte de amebas.

		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>	
		HM1	ICB-32	ICB-ADO	
<b>LEUCOFAGOCITOSE</b>	ADERÊNCIA A MN	63,4 ± 5,1 <sup>a</sup>	60,4 ± 8,0 <sup>b</sup>	18,4 ± 2,7 <sup>ab</sup>	
	ADERÊNCIA A PMN	62,8 ± 8,6 <sup>a</sup>	59,6 ± 6,4 <sup>b</sup>	16,6 ± 2,1 <sup>ab</sup>	
	FAGOCITOSE DE MN	50,6 ± 3,6 <sup>ab</sup>	22,8 ± 3,6 <sup>ac</sup>	9 ± 1,5 <sup>bc</sup>	
	FAGOCITOSE DE PMN	43 ± 4,3 <sup>ab</sup>	20,6 ± 4,7 <sup>ac</sup>	9,6 ± 2,3 <sup>bc</sup>	
	MN FAGOCITADOS MORTOS	%	40,4 ± 3,3 <sup>ab</sup>	19,2 ± 4,8 <sup>ac</sup>	5,4 ± 1,5 <sup>bc</sup>
	PMN FAGOCITADOS MORTOS		31,2 ± 2,7 <sup>ab</sup>	19 ± 3,3 <sup>ac</sup>	3 ± 1,5 <sup>bc</sup>
	AMEBAS MORTAS NA PRESENÇA DE MN		21,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	23,6 ± 3,6 <sup>b</sup>	63 ± 8,4 <sup>ab</sup>
	AMEBAS MORTAS NA PRESENÇA DE PMN		22,8 ± 2,7 <sup>ab</sup>	40,2 ± 4,0 <sup>ac</sup>	76,2 ± 6,6 <sup>bc</sup>

Médias percentuais seguidas com letras iguais em cada parâmetro avaliado indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

Incubação em PBS por uma hora a 37° C.

**Tabela 3:** Aderência entre amebas e leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) em presença e ausência de melatonina e cortisona.

		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>
		HM1	ICB-32	ICB-ADO
	Hormônio (-)	63,4 ± 5,1 <sup>ab</sup>	60,4 ± 8,0	18,4 ± 2,7
<b>MN</b>	Melatonina (+) %	80,4 ± 6,5 <sup>a</sup>	66,2 ± 4,7	17,6 ± 2,9
	Cortisona (+)	74,8 ± 4,3 <sup>b</sup>	58,2 ± 8,8	18,4 ± 3,2
	Hormônio (-)	62,8 ± 8,6 <sup>ab</sup>	59,6 ± 6,4	16,6 ± 2,1
<b>PMN</b>	Melatonina (+) %	78,2 ± 3,4 <sup>a</sup>	65,8 ± 5,3	16,3 ± 3,3
	Cortisona (+)	74,4 ± 4,3 <sup>b</sup>	60,6 ± 8,1	16,8 ± 1,4

Médias percentuais seguidas com letras iguais dentro do mesmo grupo de leucócitos indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

Incubação em PBS por uma hora a 37° C.

**Tabela 4:** Capacidade fagocítica das amebas em interações com leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) em presença e ausência de melatonina e cortisona.

		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>
		HM1	ICB-32	ICB-ADO
	Hormônio (-)	50,6 ± 3,6	22,8 ± 3,6	9 ± 1,5
<b>MN</b>	Melatonina (+) %	62 ± 7,1	21,6 ± 3,5	10,2 ± 2,3
	Cortisona (+)	49,6 ± 5,3	19 ± 2	9,8 ± 1,6
	Hormônio (-)	43 ± 4,3	20,6 ± 4,7	9,6 ± 2,3
<b>PMN</b>	Melatonina (+) %	45 ± 4,4	20,2 ± 3,7	9,6 ± 1,6
	Cortisona (+)	45,6 ± 4,0	20 ± 3,6	9 ± 2,5

Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

Incubação em PBS por uma hora a 37° C.

**Tabela 5:** Percentuais de leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) mortos durante a internalização pelas amebas em presença e ausência de melatonina e cortisona.

		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>
		HM1	ICB-32	ICB-ADO
	Hormônio (-)	40,4 ± 3,3	19,2 ± 4,8	5,4 ± 1,5
<b>MN</b>	Melatonina (+) %	40 ± 4	20,6 ± 2,4	5 ± 1,2
	Cortisona (+)	39 ± 5,5	18,8 ± 2,1	4,6 ± 1,8
	Hormônio (-)	31,2 ± 2,7	19 ± 3,3	3 ± 1,5
<b>PMN</b>	Melatonina (+) %	29,4 ± 1,6	18,2 ± 3,1	2,8 ± 1,4
	Cortisona (+)	27,8 ± 5,2	17,8 ± 2,3	2,4 ± 1,1

Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

Incubação em PBS por uma hora a 37° C.



**Tabela 6:** Percentuais de amebas mortas durante a internalização de leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) em presença e ausência de melatonina e cortisona.

		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>
		HM1	ICB-32	ICB-ADO
	Hormônio (-)	21,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	23,6 ± 3,6 <sup>c</sup>	63 ± 8,4
<b>MN</b>	Melatonina (+) %	27,4 ± 2,0 <sup>ab</sup>	30 ± 3,8 <sup>cd</sup>	66 ± 8,2
	Cortisona (+)	17,6 ± 2,1 <sup>b</sup>	16,8 ± 2,9 <sup>d</sup>	58,6 ± 8,3
	Hormônio (-)	22,8 ± 2,7 <sup>a</sup>	40,2 ± 4,0 <sup>cd</sup>	76,2 ± 6,6
<b>PMN</b>	Melatonina (+) %	28,2 ± 4,2 <sup>ab</sup>	46,4 ± 2,7 <sup>c</sup>	75,6 ± 9,7
	Cortisona (+)	19,8 ± 1,9 <sup>b</sup>	21,2 ± 2,5 <sup>d</sup>	68,8 ± 3,9

Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

Incubação em PBS por uma hora a 37° C.

### 5.3. Dosagem do Ânion Superóxido

A tabela 7 mostra que a liberação espontânea de  $O_2^-$  por trofozoítos de *E. histolytica*, *E. dispar* e leucócitos não sofreu variações pela presença da melatonina e da cortisona. As maiores níveis de superóxido em amebas foram para a cepa HM1, significativamente maior que a ICB-32 e a ICB-ADO, os níveis foram comparáveis à liberação espontânea observada em MN e PMN.

A figura 3 mostra as concentrações de ânion superóxido nas interações entre os trofozoítos e as células sanguíneas. De modo geral os índices foram maiores para PMN. O maior nível foi encontrado com incubação de PMN com a cepa ICB-32 (33,8 nmol). A incubação da cepa HM1 com PMN também gerou nível de  $O_2^-$  de 16,6 nmol, que foi significativamente maior que as interações das três cepas com MN e da ICB-ADO com PMN.

Na figura 4 destaca-se o fato da melatonina ter aumentado a concentração de  $O_2^-$  nas interações entre HM1 e leucócitos MN. Entretanto, para as amebas ICB-32 e ICB-ADO interagindo com MN, os hormônios não foram capazes de modular a liberação de superóxido (Figura 5 e 6).

A figura 7 mostra as médias de  $O_2^-$  liberado durante os ensaios entre a cepa HM1 e as células PMN, em presença e ausência dos hormônios. Tendo como parâmetro comparativo a interação PMN + HM1 (16,6 nmol), a melatonina provocou aumento do superóxido (27,8 nmol) e a cortisona causou redução (10,4 nmol).

A interação das células PMN com os trofozoítos ICB-32 gerou níveis altos de  $O_2^-$ , tanto nas incubações apenas com células, como também na presença de melatonina (Figura 8).

Na figura 9 nota-se que a melatonina não causou interferência, porém, para PMN + ICB-ADO na presença de cortisona, a liberação de superóxido foi menor quando comparada à liberação espontânea pelos leucócitos PMN isoladamente.

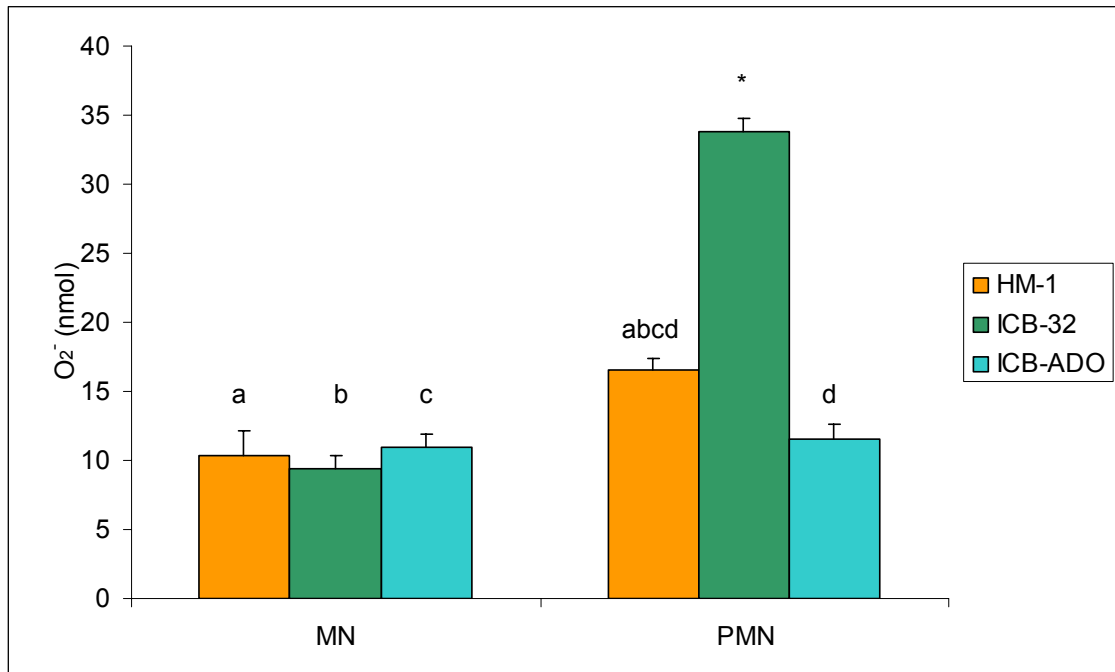
**Tabela 7:** Liberação espontânea de  $O_2^-$  por trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, bem como, por leucócitos, em presença e ausência de melatonina e cortisona.

			$O_2^-$ (nmol)
<b>HM1*</b>	Hormônio (-)		12,5 ± 2,1
	Melatonina (+)	%	11,86 ± 1,4
	Cortisona (+)		12,1 ± 2,3
<b>ICB-32</b>	Hormônio (-)		6,4 ± 0,8
	Melatonina (+)	%	6,58 ± 0,9
	Cortisona (+)		6,52 ± 1
<b>ICB-ADO</b>	Hormônio (-)		8,7 ± 0,9
	Melatonina (+)	%	8,62 ± 1
	Cortisona (+)		8,5 ± 1,4
<b>MN</b>	Hormônio (-)		11,6 ± 1,5
	Melatonina (+)	%	12,3 ± 1,8
	Cortisona (+)		11,2 ± 1,6
<b>PMN</b>	Hormônio (-)		13,56 ± 0,93
	Melatonina (+)	%	13,96 ± 0,8
	Cortisona (+)		12,7 ± 1,2

\* Indica diferenças significativas em relação às outras cepas ( $p < 0,05$ ).

Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

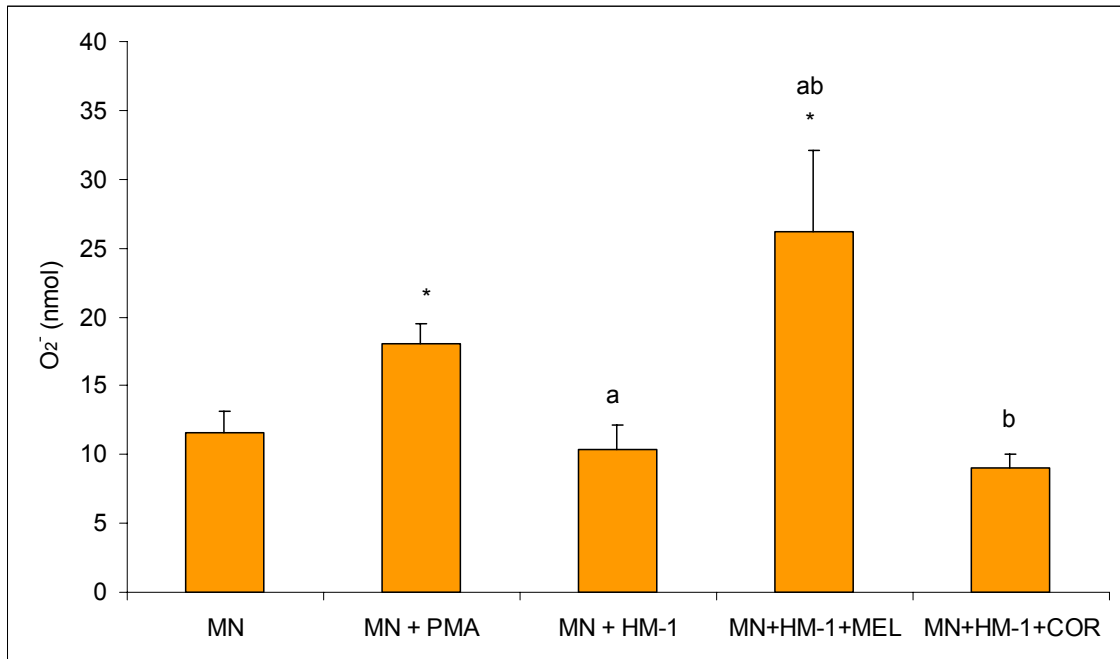
Incubação em PBS por uma hora a 37° C.



**Figura 3:** Ânion superóxido liberado durante interações entre células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) com trofozoítos de *E. histolytica* (HM1 e ICB-32) e de *E. dispar* (ICB-ADO).

\* Indica diferenças significativas com todos os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

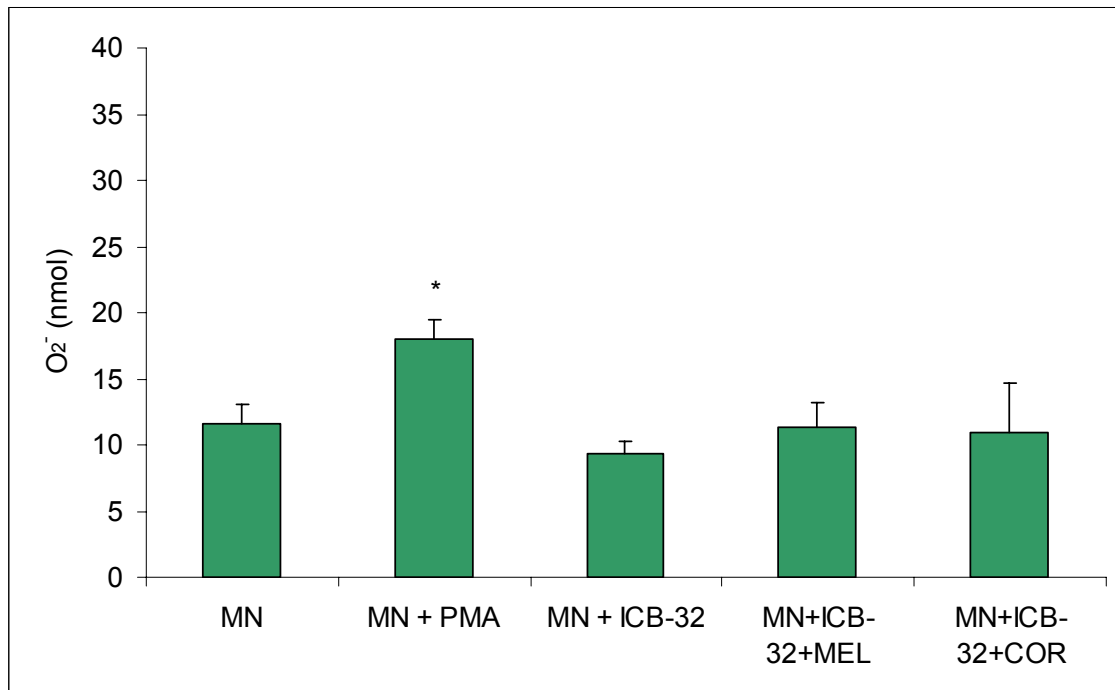
Letras iguais indicam diferenças significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4:** Ânion superóxido liberado durante as interações entre a cepa HM1 de *E. histolytica* e células sanguíneas mononucleares (MN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

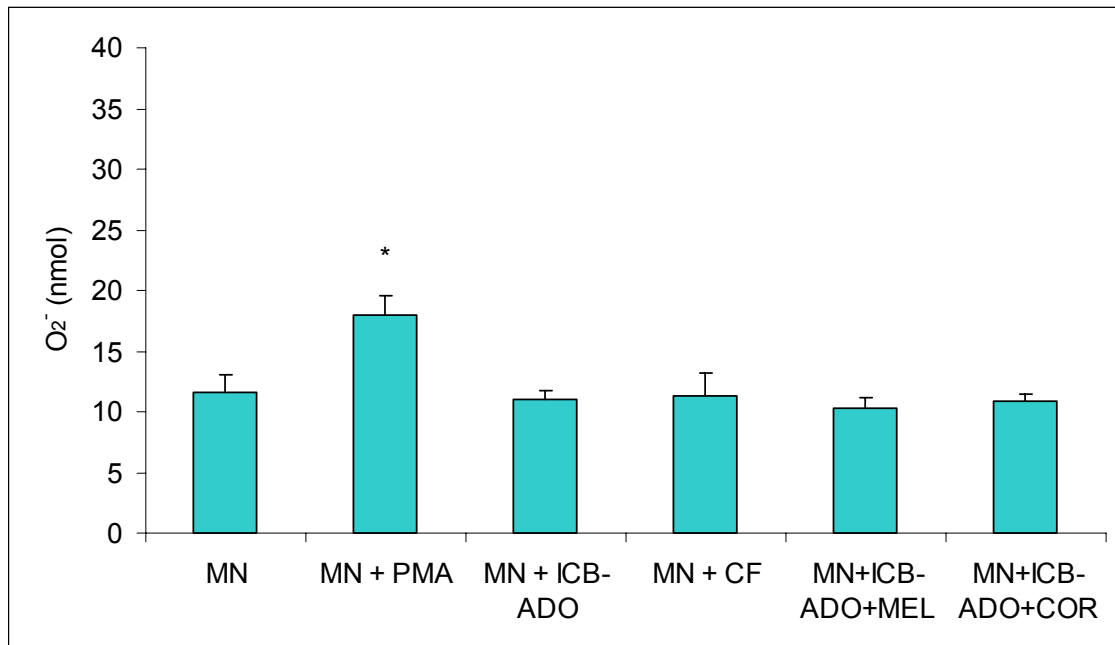
\* Indica diferenças significativas em relação ao controle (MN) ( $p < 0,05$ ).

Letras iguais indicam diferenças significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5:** Ânion superóxido liberado durante as interações entre a cepa ICB-32 de *E. histolytica* e células sanguíneas mononucleares (MN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferenças significativas em relação ao controle (MN) ( $p < 0,05$ ).

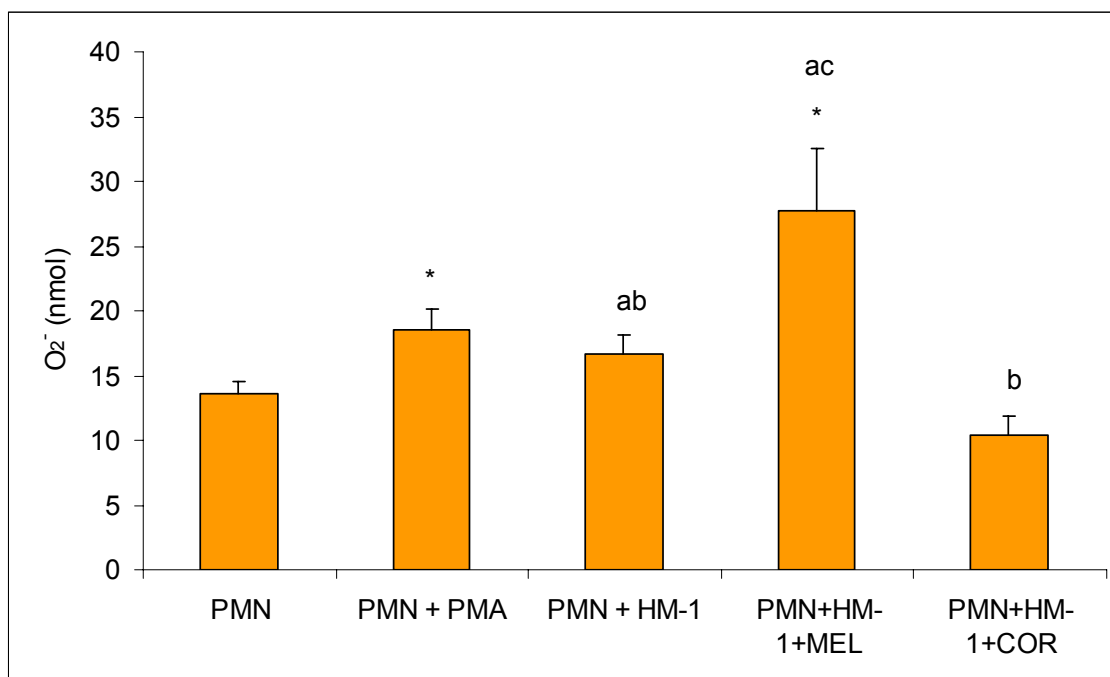


**Figura 6:** Ânion superóxido liberado durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas mononucleares (MN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferenças significativas em relação ao controle (MN) ( $p < 0,05$ ).

CF: *C. fasciculata*

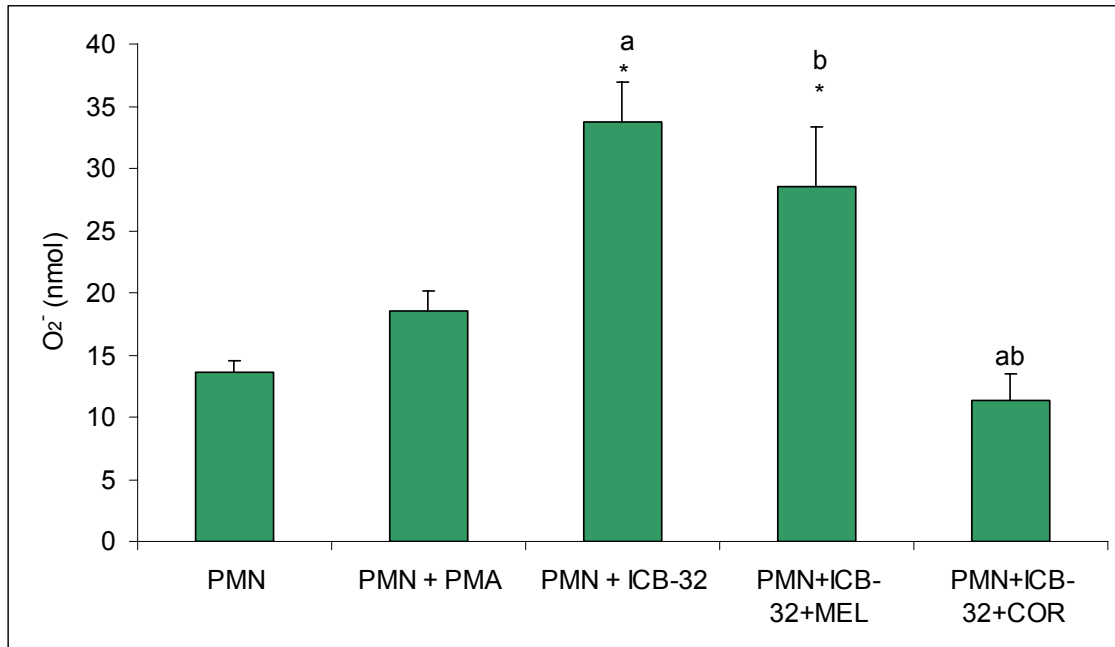




**Figura 7:** Ânion superóxido liberado durante as interações entre a cepa HM1 de *E. histolytica* e células sanguíneas polimorfonucleares (PMN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferenças significativas em relação ao controle (PMN) ( $p < 0,05$ ).

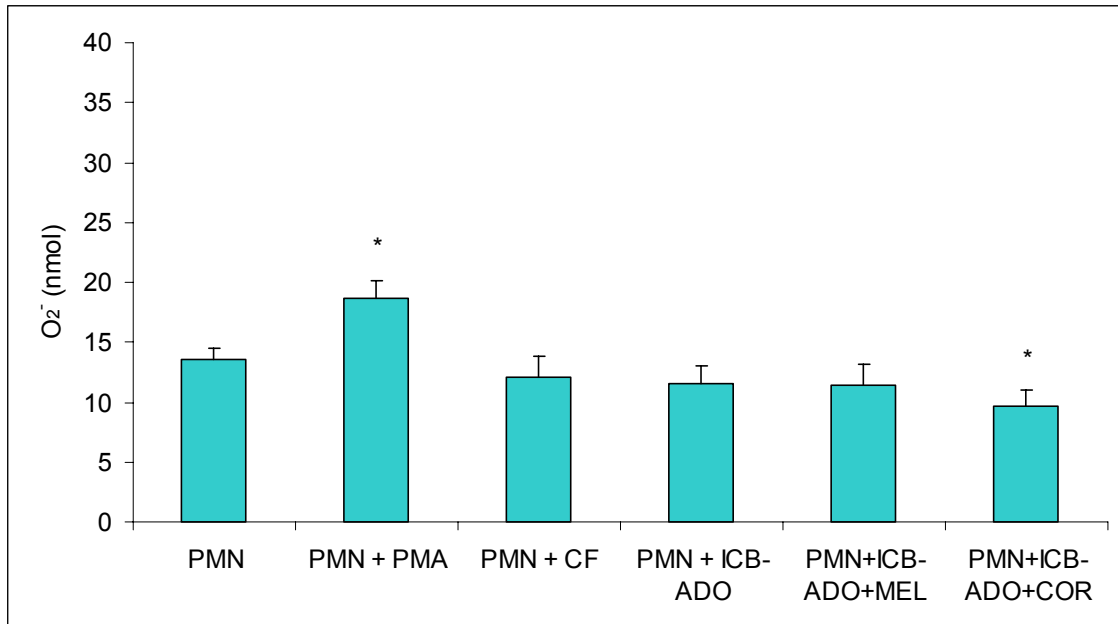
Letras iguais indicam diferenças significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8:** Ânion superóxido liberado durante as interações entre a cepa ICB-32 de *E. histolytica* e células sanguíneas polimorfonucleares (PMN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferenças significativas em relação ao controle (PMN) ( $p < 0,05$ ).

Letras iguais indicam diferenças significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** Ânion superóxido liberado durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas polimorfonucleares (PMN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferença significativa em relação ao controle (PMN) ( $p < 0,05$ ).

CF: *C. fasciculata*

#### **5.4. Dosagem da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**

A tabela 8 mostra as concentrações de SOD liberadas espontaneamente pelos trofozoítos e leucócitos, isoladamente, em presença e ausência de hormônios. As maiores concentrações de SOD em amebas foram na HM1, significativamente maior que ICB-32 e ICB-ADO, os níveis foram comparáveis à liberação espontânea observada em MN e PMN. A concentração de SOD em PMN foi maior na presença de melatonina, e menor na presença de cortisona.

Uma comparação das concentrações de SOD durante as interações entre leucócitos e amebas está destacada na figura 10. A maior concentração de SOD foi para HM1 incubada com MN (76,38 UI), seguida pelo grupo constituído da mesma ameba com PMN (66,6 UI).

A concentração de SOD nas interações de amebas HM1 com células MN, em presença e ausência de melatonina foi significativamente maior que o controle, constituído de MN em PBS, mas na presença de melatonina, o aumento foi ainda mais expressivo (Figura 11).

Os níveis de SOD nas interações de trofozoítos das cepas ICB-32 e ICB-ADO, com células MN, em presença de melatonina e cortisona não diferiram dos observados nas interações sem os hormônios (Figura 12 e 13).

Na figura 14 é possível observar que a SOD liberada nas interações da HM1 com PMN sofreu interferências hormonais. Neste caso, tanto a melatonina quanto a cortisona aumentaram a SOD.

Nas incubações de ICB-32 com leucócitos PMN, a melatonina também aumentou os níveis de SOD. No grupo com cortisona houve aumento quando comparado ao controle (PMN em PBS), mas não diferiu quando a comparação foi feita com PMN + ICB-32 sem o hormônio (Figura 15).

Quanto às interações de amebas ICB-ADO com PMN, em presença de hormônios, nota-se que as incubações dessa cepa, tanto com melatonina, quanto sem ela, tiveram níveis de SOD maiores que o controle (PMN em PBS) (Figura 16).

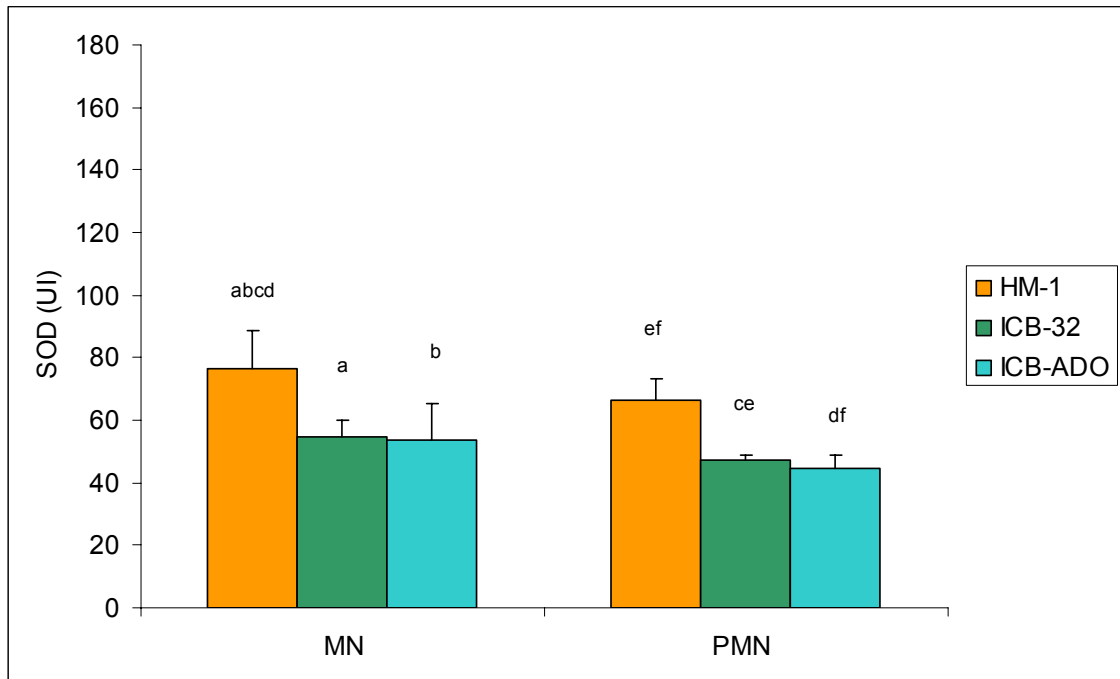
**Tabela 8:** Liberação espontânea de SOD por trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, bem como, por leucócitos, em presença e ausência de melatonina e cortisona.

			<b>SOD (UI)</b>
<b>HM1*</b>	Hormônio (-)		45,2 ± 7,2
	Melatonina (+)	%	47,2 ± 4
	Cortisona (+)		46,6 ± 2,8
<b>ICB-32</b>	Hormônio (-)		28,6 ± 4
	Melatonina (+)	%	29,8 ± 2,8
	Cortisona (+)		28,2 ± 3,3
<b>ICB-ADO</b>	Hormônio (-)		29,8 ± 5,3
	Melatonina (+)	%	28,6 ± 5,6
	Cortisona (+)		28,2 ± 4,3
<b>MN</b>	Hormônio (-)		49,6 ± 13,1
	Melatonina (+)	%	51,2 ± 7,1
	Cortisona (+)		49,4 ± 6,5
<b>PMN</b>	Hormônio (-)		30,4 ± 1,14 <sup>ab</sup>
	Melatonina (+)	%	39 ± 4,3 <sup>a</sup>
	Cortisona (+)		27,4 ± 2,7 <sup>b</sup>

\* Indica diferenças significativas em relação às outras cepas e letras iguais indicam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).

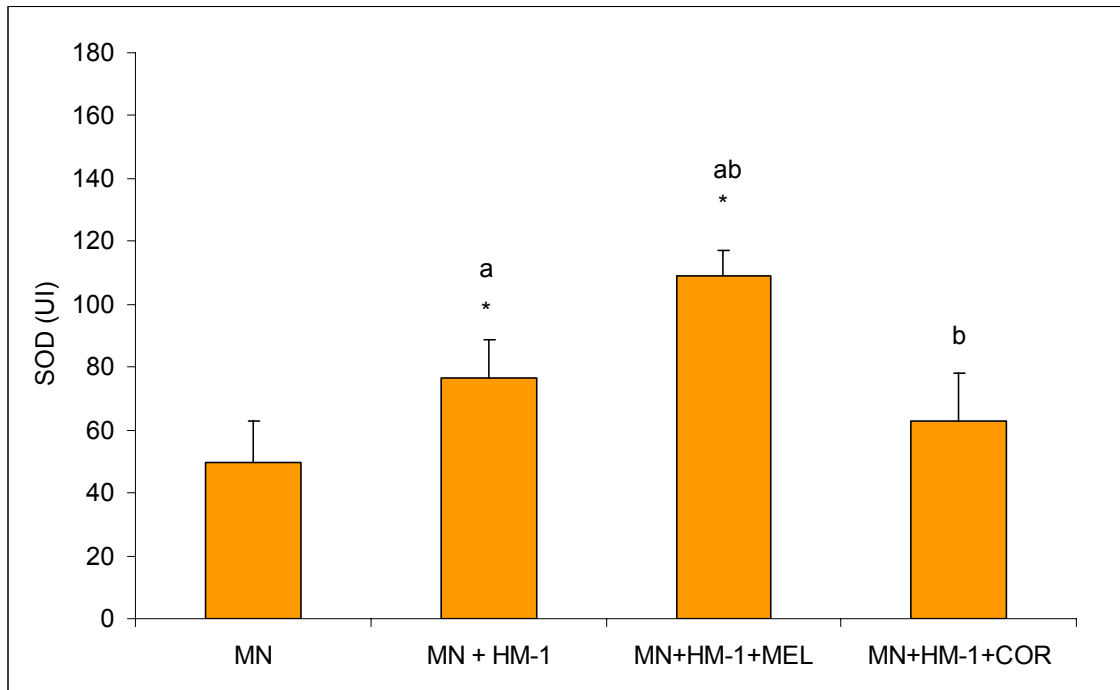
Presença de hormônio (+) e ausência de hormônio (-)

Incubação em PBS por uma hora a 37° C.



**Figura 10:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante interações entre leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) com trofozoítos de *E. histolytica* (HM1-IMSS e ICB-32) e de *E. dispar* (ICB-ADO).

Letras iguais indicam diferenças significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

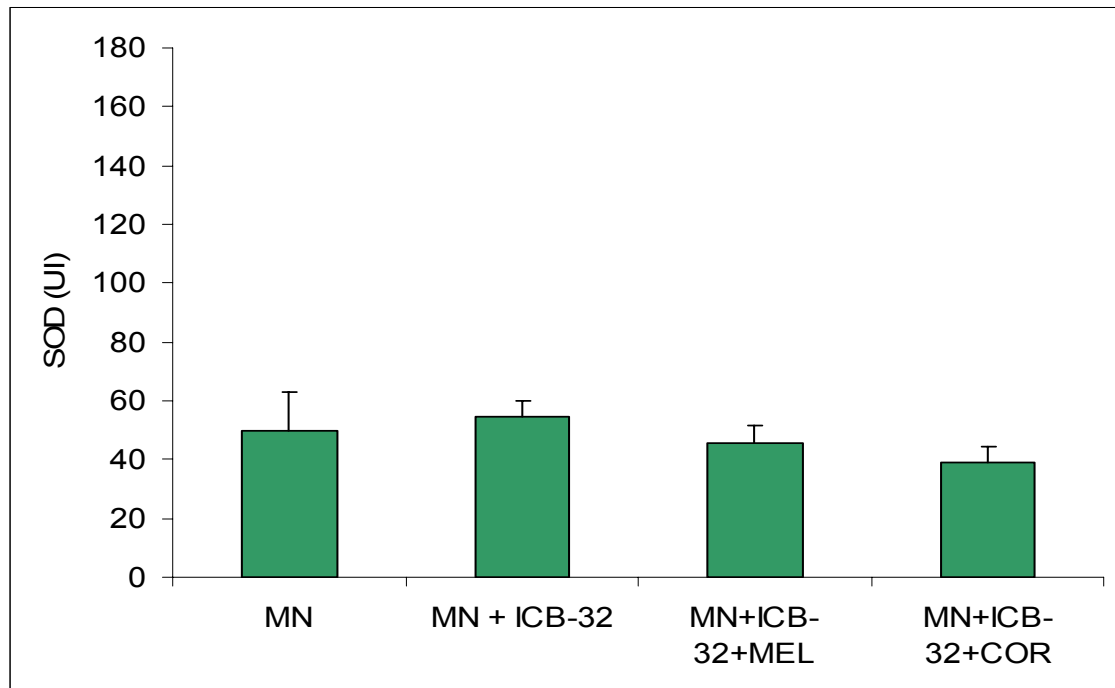


**Figura 11:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante as interações entre a cepa HM1 de *E. histolytica* e células sanguíneas mononucleares (MN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

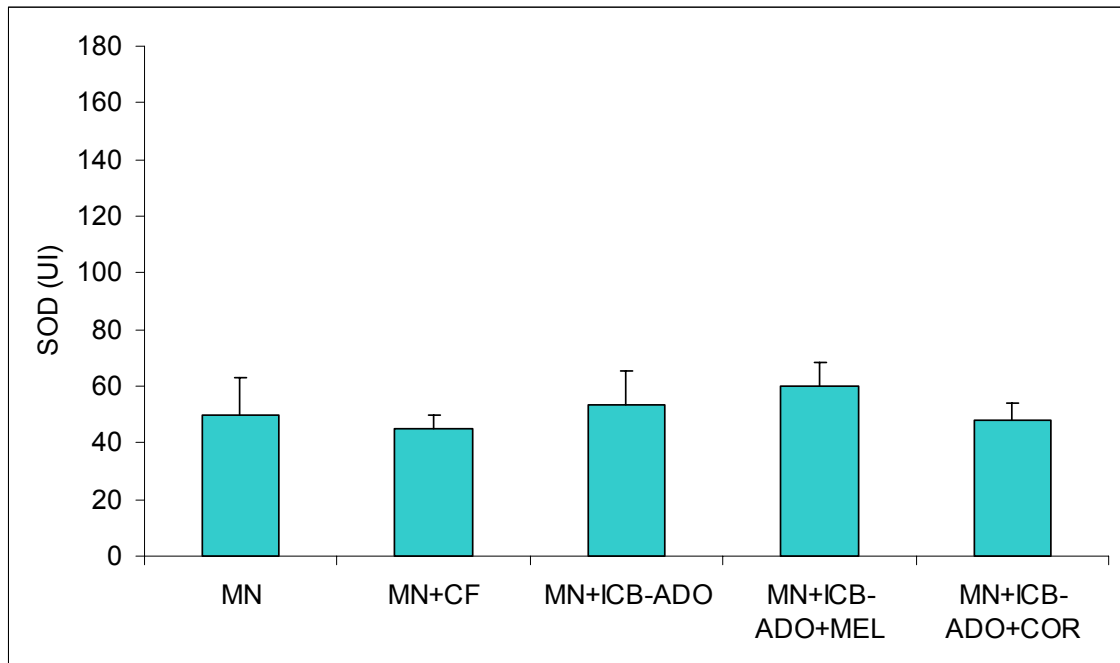
\* Indica diferença significativa em relação ao controle (MN) ( $p < 0,05$ ).

Letras iguais indicam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).



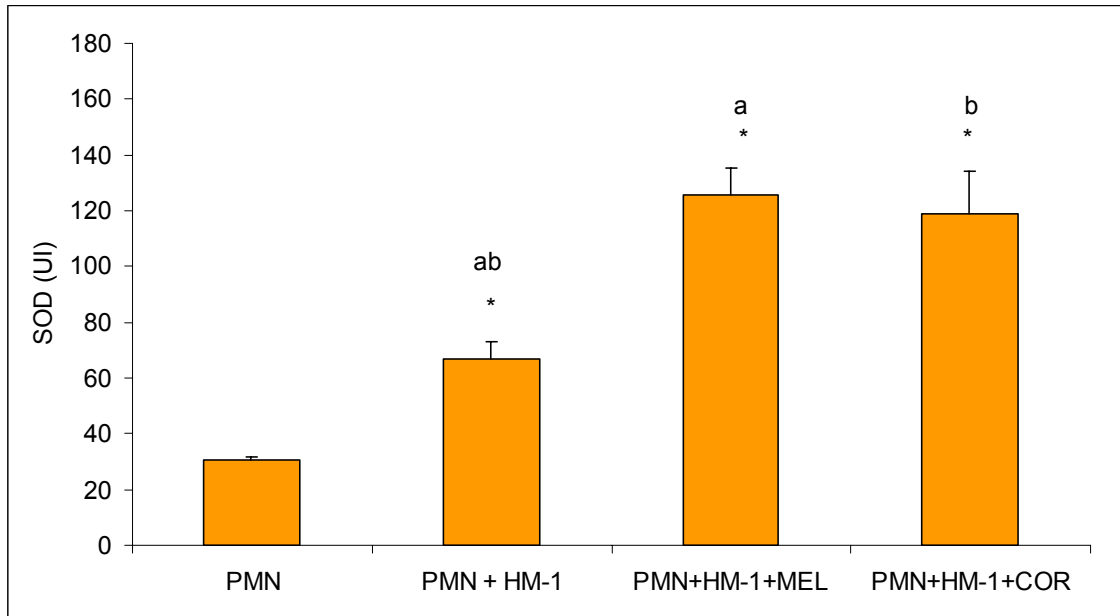


**Figura 12:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante as interações entre a cepa ICB-32 de *E. histolytica* e células sanguíneas mononucleares (MN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).



**Figura 13:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas mononucleares (MN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

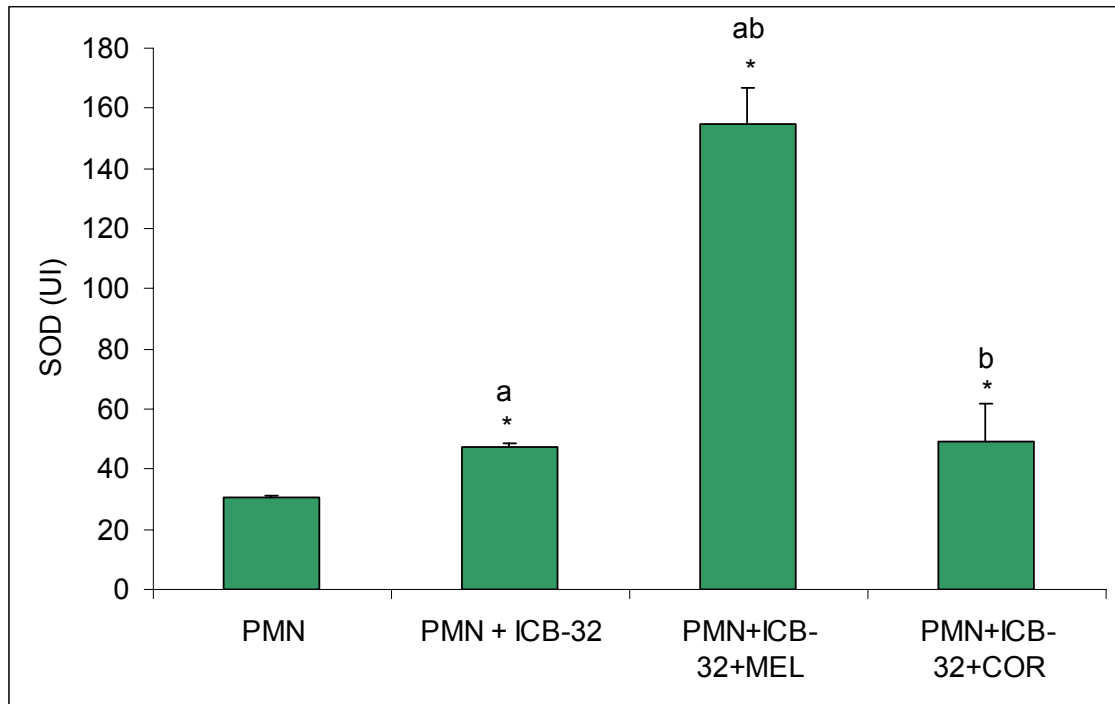
CF: *C. fasciculata*



**Figura 14:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante as interações entre a cepa HM1 de *E. histolytica* e células sanguíneas polimorfonucleares (PMN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferença significativa em relação ao controle (PMN) ( $p < 0,05$ ).

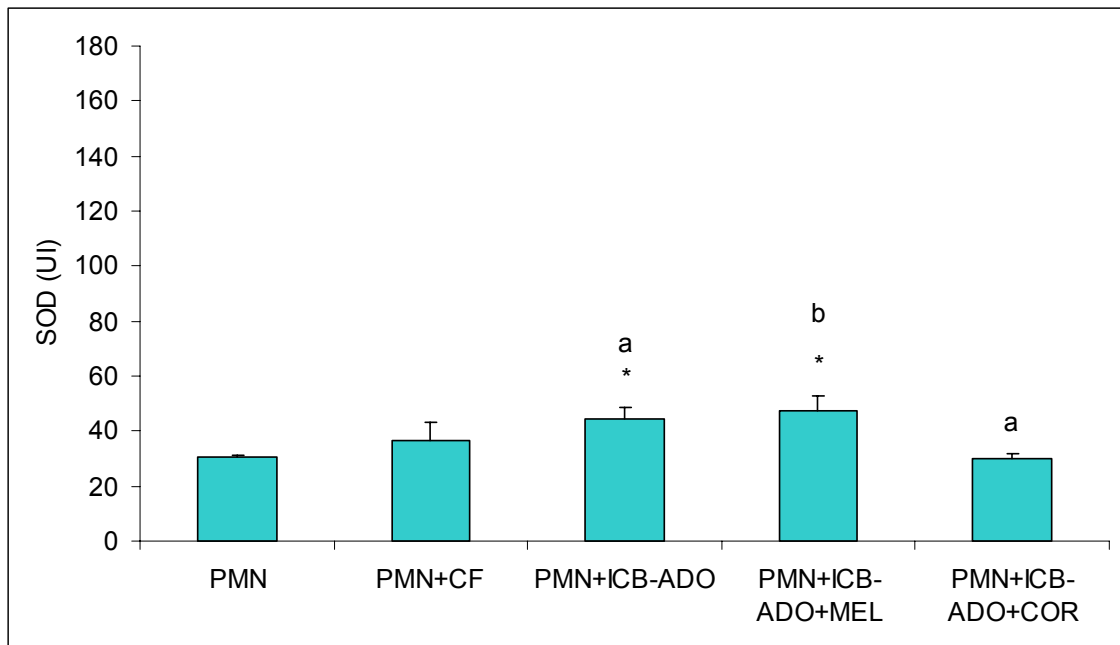
Letras iguais indicam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante as interações entre a cepa ICB-32 de *E. histolytica* e células sanguíneas polimorfonucleares (PMN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferença significativa em relação ao controle (PMN) ( $p < 0,05$ ).

Letras iguais indicam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16:** Superóxido dismutase (SOD) liberada durante as interações entre a cepa ICB-ADO de *E. dispar* e células sanguíneas polimorfonucleares (PMN), em presença e ausência de melatonina (MEL) e cortisona (COR).

\* Indica diferença significativa em relação ao controle (PMN) ( $p < 0,05$ ).

Letras iguais indicam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).

CF: *C. fasciculata*

## 5.5. Efeito da melatonina em infecções experimentais em Hamsters

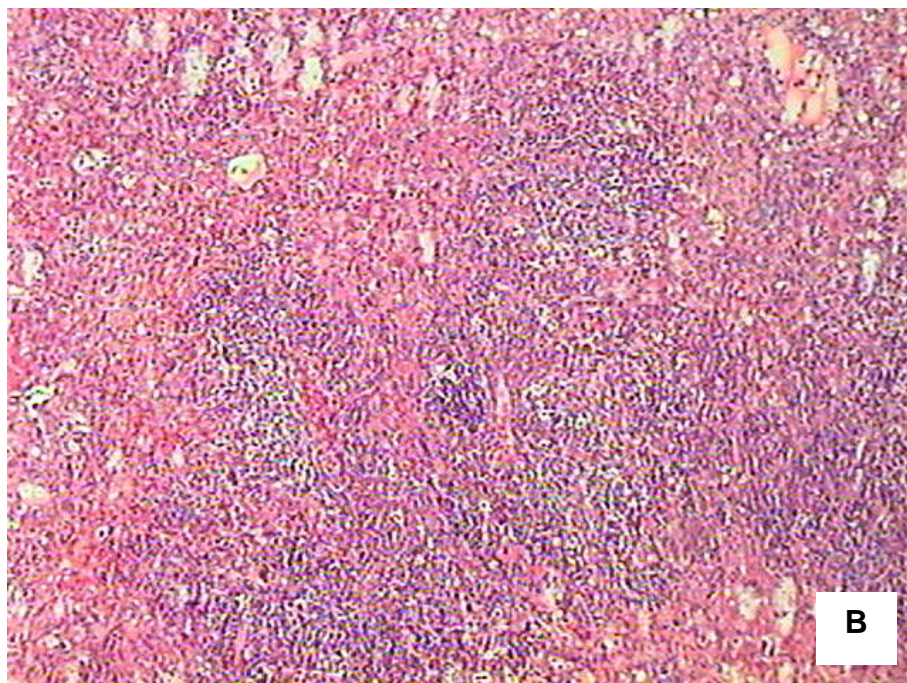
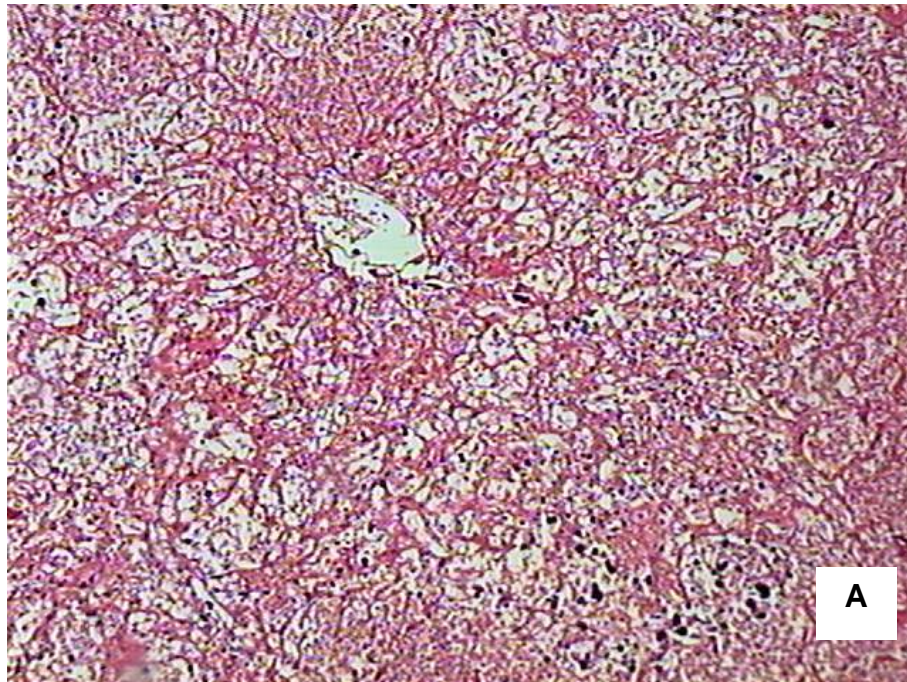
A administração de melatonina, por três diferentes vias de inoculação, com tratamento prévio de 7 dias e em doses variadas, não reduziu significativamente as lesões hepáticas dos animais observadas macroscopicamente, como mostrado a seguir.

- **Via oral** – As lesões variaram de grau III e IV nos controles e nos animais tratados com a melatonina, não havendo diferenças entre os grupos estudados mesmo quando da utilização da dose de 50 mg/Kg.
- **Via intraperitoneal** – Foram observadas lesões de grau III e IV, como esperado para a cepa, mas alguns animais que receberam melatonina apresentaram redução das lesões sendo observadas lesões pontuais (grau I), e, em alguns casos, o grau II de comprometimento hepático. Contudo estes resultados não foram significativos quando comparados aos controles.
- **Via subcutânea** – Não foram observadas diferenças significativas na gravidade das lesões produzidas pela *E. histolytica* nos animais submetidos ao tratamento com melatonina veiculada em água ou etanol 70% e os controles.

### 5.5.1 Análise histopatológica do fígado de hamsters inoculados com *E. histolytica* com e sem tratamento com melatonina.

A figura 17 ilustra a análise histopatológica do fígado dos hamsters sem a presença de melatonina (A) e com a melatonina (B). Nota-se que a área de destruição tecidual dos animais que receberam tratamento com melatonina foi menor

quando comparado aos controles sem melatonina. A verificação microscópica da necrose dos tecidos dos animais que não receberam tratamento evidenciou que freqüentemente era distribuída em amplas zonas. Nos animais que receberam melatonina encontrou-se parte de tecido normal entremeando regiões necrosadas. O infiltrado inflamatório de alguns animais tratados com melatonina pareceu ser constituído de maior número de linfócitos e macrófagos.



**Figura 17:** Fígado de hamsters inoculados com a cepa HM1 de *E. histolytica*. Sem tratamento com melatonina (A) e tratado com melatonina (B). H&E X100.



## 6. DISCUSSÃO

A amebíase está entre as principais enfermidades parasitárias, sendo amplamente difundida em todo o mundo, ocasionando morbidade e mortalidade significativas, visto que, pode causar a disenteria amebiana e abscesso hepático. Globalmente a doença leva ao óbito anualmente cerca de 100.000 pessoas (WHO, 1997; STANLEY-JR, 2003; VAN-HAL *et al.*, 2007; PRITT; CLARK, 2008).

Diante dessa realidade, estudos envolvendo aspectos ainda obscuros relativos ao protozoário causador da doença são relevantes. O presente trabalho comparou, através de ensaios *in vitro*, duas cepas de *E. histolytica* e uma de *E. dispar*, quanto à capacidade de eritrofagocitose e leucofagocitose, além de avaliar aspectos relacionados ao estresse oxidativo que as amebas, especialmente as formas invasivas, estão sujeitas no organismo humano.

Vários parâmetros são utilizados para a caracterização quanto à virulência de diferentes cepas de *E. histolytica* e para a investigação da patogenicidade de *E. dispar*, dentre eles, está a eritrofagocitose. *In vivo* a eritrofagocitose é característica de amebíase invasiva e a deficiência em realizar eritrofagocitose é considerada fator de avirulência (BOETTNER *et al.*, 2005).

Neste estudo foi possível confirmar que a cepa HM1 de *E. histolytica* apresenta grande capacidade de internalização de eritrócitos, o que corrobora com a forma clínica e espécie das quais as amebas foram isoladas, visto que se trata de uma cepa reconhecidamente virulenta, isolada de colite disentérica. Nossos resultados estão de acordo com a literatura (TRISSL *et al.*, 1978; BATISTA; SOUZA, 2004, BOETTNER *et al.*, 2005).

*E. dispar* e a cepa ICB-32 de *E. histolytica* tiveram comportamentos diferentes da virulenta HM1, a capacidade de eritrofagocitose, bem como o número de eritrócitos internalizados foram bem mais modestos que os alcançados pela HM1. Estes resultados confirmam os encontrados por Gomes *et al.* (1997) para diferentes cepas de *E. histolytica*.

Pouco é conhecido sobre a capacidade fagocítica de *E. dispar*. Pillai, Kobayashi e Kain (2001) mostraram que a lectina de aderência Gal/GalNac era menos comum na superfície de *E. dispar*. Pimenta, Diamond e Mirelman (2002) descreveram a formação de vesículas menores em *E. dispar* durante a ingestão de bactérias.

Mitra *et al.* (2005) mostrou diferenças entre *E. histolytica* e *E. dispar* quanto à fagocitose de bactérias, descreveu alterações na morfologia, acidificação e degradação dos fagossomas.

Boettner *et al.* (2005) procuraram determinar quais ligantes eram reconhecidos nos eritrócitos para que *E. histolytica* realizasse fagocitose e se *E. dispar* também reconhecia esses ligantes. Eles constataram que *E. histolytica* provoca mudanças nos eritrócitos antes da ingestão, incluindo exposição da fosfatidilserina, que é reconhecida pelas amebas. *E. dispar* foi relativamente deficiente nas etapas da fagocitose, como a aderência e a internalização.

Voigt *et al.* (1999) enfatizaram que a patogenicidade requer uma dinâmica do citoesqueleto da ameba que permita movimento, penetração nos tecidos e mudanças de formas dos trofozoítos. Destacaram que a miosina B está envolvida na fagocitose de eritrócitos humanos, pois, em sua ausência havia falhas na eritrofagocitose.

Todos esses relatos, enfatizando diferenças, juntamente com os resultados obtidos no presente estudo, nos levam a inferir que possivelmente ICB-ADO e ICB32 apresentam diferenças estruturais em relação a HM1 que justifiquem a menor capacidade de eritrofagocitose.

Durante a infecção por *E. histolytica*, as células epiteliais intestinais servem como sensores da infecção e iniciam uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro. Linhagens de células epiteliais ativadas produzem uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-2 e COX 2 (ciclooxigenase 2). Células de defesa do hospedeiro, especialmente, macrófagos e neutrófilos, são atraídos para o local de invasão (STANLEY-JR; REED, 2001).

A fagocitose desempenha um importante papel na patogenicidade de *E. histolytica*, portanto, a habilidade de fagocitar não apenas eritrócitos, mas também bactérias e células humanas têm sido objetos de investigações. Diante disso, uma avaliação ampla da capacidade fagocítica das amebas envolve além da eritrofagocitose, a leucofagocitose.

Neste trabalho, pioneiramente, buscou-se realizar uma ampla comparação entre cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* quanto aos parâmetros de atividade fagocítica diante de leucócitos, que envolve: aderência, fagocitose, morte de células internalizadas e morte das amebas durante o processo.

Os resultados encontrados referentes à leucofagocitose indicam que, de modo geral, a aderência e a fagocitose foram similares para MN e PMN. A cepa HM1 obteve maiores índices de aderência em relação a *E. dispar* e maiores índices de fagocitose que as outras cepas. A cepa HM1 também foi mais hábil em matar os leucócitos internalizados, especialmente MN, e morreram menos durante o processo de fagocitose. Isso tudo seria esperado, já que se trata de amebas altamente

virulentas. A relação da leucofagocitose com a virulência pôde ainda ser confirmada neste trabalho pelos índices significativamente mais baixos de leucofagocitose das cepas ICB-32 e ICB-ADO.

A cepa ICB-32 foi isolada de assintomático e foi avirulenta quanto à inoculação em fígado de hamster (Silva, 1997). Os trofozoítos da cepa ICB-ADO de *E. dispar*, espécie não invasiva, quando em cultivo com *C. fasciculata*, não foram virulentos em teste *in vivo* e *in vitro* (Costa *et al.* 2006).

Estudos clássicos envolvendo amebas e leucócitos, como de Jarumilinta e Kradofer (1964) e Guerrant *et al.* (1981) demonstraram que amebas virulentas são letais para leucócitos.

Salata, Pearson e Ravdin (1985) também demonstraram o poder dos trofozoítos de *E. histolytica* (HM1) em matar leucócitos PMN e MN. As amebas foram capazes de matar leucócitos mesmo quando proveniente de soro previamente imunizado.

Guerrant *et al.* (1981) descreveram a interação entre *E. histolytica* e PMNs. Os estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que trofozoítos de cepas de *E. histolytica* menos virulentas eram circundadas por PMNs, fragmentados e ingeridos por PMNs. Em contraste, trofozoítos de cepas de amebas mais virulentas causaram perda na motilidade destes leucócitos, que eram fagocitados e mortos pelas mesmas.

Um estudo mostrou que, em presença de IFN- $\gamma$ , os macrófagos *in vitro* apresentavam maior capacidade de matar trofozoítos de *E. histolytica* (IP:0682:1). A atividade amebicida foi determinada após a incubação de macrófagos e trofozoítos por quatro horas, com posterior contagem do número de trofozoítos mortos. O tratamento com IFN- $\gamma$  ativou macrófagos peritoniais de camundongos para matar as

amebas, evidenciando que, quando ativados, são significativamente mais eficazes (GHADIRIAN; DENIS, 1992).

Sanchez-Guillen *et al.* (2002) realizaram estudo clínico mostrando que a amebíase invasiva tinha correlação com os níveis de IL-4, associados a um perfil de resposta Th2, e a resistência à invasão, nos portadores assintomáticos, relacionava-se à resposta Th1, com altos níveis de IFN- $\gamma$ .

O papel de citocinas nas interações também foi avaliado num trabalho que mostrou que a resposta imune a LPPG é mediada por receptores toll-like 2 e 4. O balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias produzidas por MNs regula as respostas imunes inatas, e, seu desequilíbrio é prejudicial para o hospedeiro. A LPPG, quando utilizada para desafiar os MN, estimulou a produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-10, portanto, o parasito pode modular a resposta do hospedeiro a seu favor (MALDONADO-BERNAL, 2005).

Um estudo recente mostrou que na colite amebiana as áreas de lesões apresentam alta concentração de neutrófilos e linfócitos. Os autores defendem a teoria de que a interação entre os PMNs com os trofozoítos contribui para a patogenicidade (DICKSON-GONZALEZ; URIBE; RODRIGUEZ-MORALES, 2008).

No presente trabalho, considerando os tipos de leucócitos, de modo geral, os níveis mais altos de superóxido foram obtidos com incubações amebas-PMN. Em presença das cepas HM1 e ICB-32 as concentrações aumentaram, e surpreendentemente, isso foi ainda mais significativo para a cepa ICB-32, o que talvez esteja relacionado às diferenças no arsenal de substâncias desintoxicantes, que pode estar mais desenvolvido na virulenta HM1, ou às diferenças na capacidade das cepas inibirem a produção de superóxido pelos leucócitos. É importante destacar que a SOD foi encontrada em maior concentração nesta cepa, o que

justificaria um nível mais baixo de superóxido nas incubações de PMN com HM1, em comparação a ICB-32. Com a ICB-ADO, os níveis de  $O_2^-$  foram os mais baixos encontrados, entretanto, ao contrário do que aconteceu com a HM1, os níveis de SOD também foram baixos, o que pode indicar que os leucócitos utilizaram mecanismos não oxidativos para destruir essas amebas, ou que, a cepa é tão susceptível ao  $O_2^-$  que, mesmo em níveis baixos foi destruída. Além disso, a cepa pode ser tão atenuada a ponto de ter limitada capacidade de produzir a SOD e foi morta por outros mecanismos menos lesivos aos próprios leucócitos.

Há pouca informação na literatura quanto à dosagem de superóxido em interações entre amebas e leucócitos e os resultados são controversos. Lin, Keller e Chadee (1993) investigaram o efeito da cepa HM1 no *burst* oxidativo dos macrófagos. O tratamento de macrófagos peritoniais com proteínas solúveis de amebas aumentou a liberação de  $O_2^-$  e de  $H_2O_2$  de maneira dose dependente.

Ghadirian e Kongshavn (1988) estudando interações de MN com duas cepas de *E. histolytica*, uma virulenta e outra não, constatou que os níveis de superóxido produzidos por macrófagos eram maiores em presença de ambas, especialmente com a cepa virulenta.

Gandhi *et al.* (1987) detectaram que células PMN provenientes de pacientes com formas graves de amebíase apresentavam níveis altos de superóxido, o que não era observado em células de pacientes com formas não invasivas.

Entretanto, Arbo *et al.* (1990) mostrou que a resposta oxidativa dos neutrófilos sofria uma redução em presença de amebas. Manrique *et al.* (2002) não encontraram aumento da produção de superóxido por células PMN em presença de antígenos de cepas patogênicas de *E. histolytica*.

Durante a invasão, os trofozoítos são expostos a quantidades elevadas de espécies reativas do oxigênio, tais como o radical superóxido. Segundo Ramos-Martinez *et al.* (2008) o fenótipo de *E. histolytica* altamente virulento está relacionado a grande habilidade de reduzir o superóxido.

*E. histolytica* produz SOD contendo ferro, que é induzida pelo ânion superóxido, levando a produção de  $H_2O_2$ . Além da SOD, a NADPH:flavina oxidoreductase (Eh34) também tem um papel antioxidante convertendo oxigênio em  $H_2O_2$ , que por sua vez pode ser eliminada pela enzima peroxiredoxina (BRUCHHAUS; RICHTER; TANNICH, 1998).

Estudos mostraram que a SOD e enzima de superfície EH29 (peroxidase tiol-dependente), que age bloqueando radicais livres, aumentam significativamente quando os trofozoítos são expostos a altos níveis de oxigênio, sugerindo que ambas estão envolvidas na sobrevivência do parasito ao estresse oxidativo (AKBAR *et al.*, 2004; SEN *et al.*, 2007).

Este trabalho mostrou a presença de superóxido e SOD mesmo quando havia apenas amebas, portanto nas interações amebas-leucócitos a origem desses elementos poderiam partir de ambos. Níveis mais altos de  $O_2^-$  e SOD foram obtidos com HM1. Alguns trabalhos confirmaram a existência de superóxido em amebas. Akbar (2004) relatou presença de radicais livres em trofozoítos quando estavam em ambientes ricos em oxigênio. Muñoz-Sanchez *et al.* (1997) afirmaram que amebas em culturas produzem radicais livres do oxigênio com capacidade de gerar danos biológicos. Crisóstomo-Vazquez *et al.* (2002) avaliaram a relação dos radicais livres produzidos por *E. histolytica* com proteases (azocaseína e azoalbumina), sugerindo que os radicais livres auxiliam a ação das proteases.

Chen *et al.* (1996) mostraram que a sobrevivência do parasito em locais com altas concentrações de oxigênio é devido a um conjunto enzimático composto de SOD, catalase e peroxidase. Naquele trabalho a concentração de SOD nas amebas foi ainda maior que o obtido aqui, mas, isso pode estar relacionado à metodologia empregada (pyrogallol-NBT colorimetric assay) e ao tipo de cepa avaliada, que foi a patogênica denominada *El Ganzhou*.

A melatonina tem sido relatada como capaz de interferirem nas respostas imunes inatas (PAREDES *et al.*, 2007). Em recente relato, Pena *et al.* (2007) reforça o aspecto imunomodulador da melatonina. Voluntários humanos tratados com 20mg diárias de melatonina tiveram aumento da resposta quimiotática para PMN, mas uma redução dessa resposta foi observada para MN.

Barriga *et al.* (2001) avaliaram o ritmo circadiano da melatonina, cortisol, fagocitose e o efeito do estresse. Os animais submetidos a estresse tiveram níveis mais baixos de melatonina, porém, os níveis de cortisol no soro e a capacidade fagocítica de macrófagos foram maiores.

Sanchez *et al.* (2008) administraram em ratos o triptofano, precursor da melatonina, e observou a atividade fagocítica. Os resultados mostraram aumento da resposta fagocítica e da desintoxicação de radicais livres como o superóxido.

Um estudo avaliou a melatonina como imunomodulador das alterações histopatológicas relacionadas à esquistossomose, evidenciando que a ação antioxidante da melatonina é altamente protetora, quando administrada após a infecção por *Schistosoma mansoni* sendo capaz de reduzir danos no fígado e no baço (EL-SOKKARY *et al.*, 2002).

Há poucos relatos quanto às interferências da melatonina em infecções por protozoários. Os escassos estudos publicados avaliaram interferências em casos de



toxoplasmose (BALTACI *et al.*, 2003; BALTACI *et al.*, 2004; BALTACI *et al.*, 2005). Considerando os percentuais de linfócitos CD4 e CD8, a deficiência de melatonina (pinealectomizados) tem influência negativa na imunidade celular de ratos com toxoplasmose (BALTACI *et al.*, 2005).

Santello *et al.* (2007) mostrou que a melatonina pode ser útil no tratamento da tripanossomíase, pois reduz a severidade da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. Recentemente, também foi mostrado que a melatonina aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias na doença de Chagas, o que constitui um fator de proteção (SANTELLO *et al.*, 2008).

Budu *et al.* (2007) mostrou uma perspectiva terapêutica da melatonina para o tratamento da malária. Eles afirmam que *N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine* (AFMK), um produto de degradação da melatonina, tem efeito sincronizador para o *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium falciparum*, modulando o ciclo de vida do parasito.

Embora a literatura tenha mostrado vários resultados promissores para uso da melatonina exógena, há também relatos de falta de eficácia quanto ao seu uso. Spreer *et al.* (2006) utilizando modelos *in vivo* de meningite bacteriana observaram que embora existisse uma ação antiinflamatória com a terapêutica combinada, constituída de antibióticos e melatonina, os danos teciduais não eram reduzidos pelo hormônio. E os resultados de outro estudo mostraram que níveis altos de melatonina podem exacerbar infecção por *Salmonella enteritidis* em aves (NISBET *et al.*, 2008).

Este nosso estudo foi o primeiro a investigar *in vitro* e *in vivo* o papel modulador da melatonina em relação à *E. histolytica*. Os dados mostraram que a melatonina aumentou a taxa de aderência de leucócitos para a cepa HM1. Quanto à morte das amebas, HM1 e ICB-32 morreram mais quando havia melatonina nas

incubações. Entretanto, a adição de hormônios não foi capaz de interferir significativamente no poder de eritrofagocitose das amebas, o que pode ser indicativo de que a ação dos hormônios aconteça prioritariamente nas células de defesa.

Em relação ao estresse oxidativo, observaram-se interferências hormonais, principalmente com a melatonina. A interação da cepa HM1 tanto com MN, quanto com PMN, em presença de melatonina, apresentou níveis significativamente mais altos de  $O_2^-$ . Estes resultados sinalizam que a cepa virulenta estimule mais eficientemente o burst oxidativo nos leucócitos. A cortisona reduziu a concentração de superóxido nas incubações com PMN, mostrando uma ação imunoreguladora, corroborando com outros estudos também realizados com glicocorticóides (MIYATA *et al.*, 1995; CABRERA, *et al.*, 2001).

Os níveis de SOD nas incubações entre leucócitos e cepas de *E. histolytica* em presença de melatonina foram mais altos que em sua ausência, o mesmo não ocorrendo para *E. dispar*, portanto ocorreriam diferenças entre espécies, reforçando a idéia de que a SOD liberada pelas amebas possa refletir um mecanismo de adaptação das amebas aos locais ricos em superóxido, esse mecanismo parece ser falho em *E. dispar*.

No estudo realizado por França (2002), utilizando EPEC, a melatonina modulou a atividade funcional de fagócitos, foi capaz de aumentar a fagocitose, a atividade microbicida e a liberação de ânion superóxido. A cortisona determinou aumento na liberação de superóxido por leucócitos provenientes do colostro, mas diminuição para os do sangue.

No presente trabalho foi possível perceber diferenças significativas tanto na eritrofagocitose quanto na leucofagocitose, não apenas entre espécies, mas também

entre as cepas. Ficou evidente que, para a virulenta HM1, a melatonina *in vitro* apresenta funções moduladoras nas interações entre essas amebas e os leucócitos humanos, especialmente em relação ao contato, morte das amebas e estresse oxidativo.

Por outro lado, *in vivo*, a melatonina, um hormônio reconhecidamente imunomodulador, não foi capaz de deter a ação destruidora das amebas no fígado dos hamsters. Apesar das zonas de necroses apresentarem diferenças no que tange a extensão das lesões e ao infiltrado inflamatório, estas diferenças não levaram a redução dos danos teciduais observados macroscopicamente, sugerindo que o parasito apresenta eficazes mecanismos de escape do sistema imune. Por exemplo, há aumento da produção de SOD, neutralizando o superóxido, abrindo espaço para a progressão da lesão, através da liberação de amebaporos e cisteína proteinases pelas amebas. Além disso, elementos provenientes dos leucócitos, como o superóxido, em altas concentrações, poderiam contribuir também para os danos teciduais.

Essa idéia da forte resistência das amebas aos elementos do sistema imune do hospedeiro é reforçada por vários autores. Santi-Rocca *et al.* (2009) relata que quando confrontados com células de defesa do hospedeiro, os trofozoítos tendem a se adaptar ao seu novo ambiente e modular as respostas, levando à sobrevivência parasitária mesmo quando são formados focos inflamatórios.

Estudos mostraram que a SOD e a enzima de superfície EH29 aumentam significativamente quando os trofozoítos são expostos a altos níveis de oxigênio, sugerindo que ambas estão envolvidas na sobrevivência do parasito ao estresse oxidativo (ANKRI, 2002; AKBAR *et al.*, 2004; SEN *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as amebas também apresentam resistência ao óxido nítrico, interferindo na síntese desse elemento nos macrófagos e também catabolizando-o. Em relação aos neutrófilos, a proteína Ehserp presente em cepas de *E. histolytica* inibe a ação dessas células, reduzindo a atividade da catepsina G, importante elemento durante a inflamação (TANI *et al.*, 2001; ANKRI, 2002). Estes resultados reforçam a teoria de que as cepas mais virulentas lançariam mão de mecanismos eficientes em inibir a produção de radicais livres pelos leucócitos, além do bloqueio dos mesmos com a produção de SOD.

Outro aspecto a ser destacado refere-se à importância da interação com a microbiota intestinal na virulência de *E. histolytica*. A resistência das amebas em relação às células de defesa *in vivo* pode também sofrer interferência de outros microrganismos. Tem sido proposto que um aumento da patogenicidade de *E. histolytica* pode ser ocasionado pela interação com bactérias presentes no intestino do hospedeiro.

Galván-Moroyoqui *et al.* (2008) mostrou que a interação entre as amebas com bactérias enteropatogênicas provoca aumento da virulência das amebas, ocasionando maiores danos para as células epiteliais.

A interação de isolados de amebas de baixa patogenicidade com uma variedade de bactérias gram-negativas, principalmente *E. coli*, que são facilmente ingeridas pelo amebas, provoca aumento significativo da capacidade dos trofozoítos de ingerir e destruir células epiteliais intestinais, secretarem substâncias citopáticas e causarem lesões hepáticas em hamsters (MIRELMAN *et al.*, 1983).

Um recente estudo *in vitro* mostrou aumento de patogenicidade de trofozoítos em cultivo xênico (PYSOVA *et al.*, 2009), corroborando com Furst *et al.* (2002) e Costa *et al.* (2007), que mostraram que *E. dispar* apesar de ser considerada não-

patogênica, em associação com a microbiota específica, pode produzir danos hepáticos em hamsters. Em cultivo xênico, trofozoítos de *E. dispar* além de induzir severas lesões hepáticas, apresentam atividade lítica para células VERO.

Embora a amebíase seja amplamente distribuída, nos países em desenvolvimento as taxas de prevalência tendem a serem maiores. O investimento em saneamento básico geralmente está muito aquém do necessário, possibilitando a expansão da amebíase, através da transmissão oro-fecal. Melhorias no serviço de saúde pública reduziriam a doença, porém, uma falta de progresso significativa nesta área, ocasionou uma necessidade de entender cada vez mais a biologia do parasito e sua patogenicidade, para desenvolver métodos mais eficazes de tratamento e prevenção da doença.

Este trabalho propôs conhecer um pouco mais sobre as interações entre células sanguíneas e trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, tentando esclarecer como esse protozoário, especializado em fagocitose, se comporta ao se deparar com células humanas, algumas também altamente preparadas para a fagocitose. O universo dessas interações está longe de ser desvendado, mas encontramos respostas interessantes e surgiram perspectivas para investigações futuras, como conhecer melhor os mecanismos de escape que *E. histolytica* utiliza *in vivo* para evadir das respostas imunes do hospedeiro. Além disso, novos estudos focados na melatonina podem confirmar o que foi sugerido aqui, a melatonina poderia ser útil como adjuvante da terapia anti-amebiana.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ A capacidade fagocítica das amebas é variável conforme a cepa. Em relação à eritrofagocitose, o percentual de amebas fagocíticas e número de eritrócitos fagocitados, variaram de acordo com a cepa, sendo a cepa mais virulenta (HM1) a de maior poder de internalizar eritrócitos. Quanto à leucofagocitose, as amebas HM1 tiveram maiores índices de aderência e fagocitose que as outras cepas. Essas amebas também foram mais hábeis em matar os leucócitos internalizados, especialmente MN, e morreram menos durante o processo de fagocitose.
- ✓ Os níveis mais altos de superóxido foram com incubações de PMN, em presença de amebas ICB-32, sugerindo diferenças entre as cepas quanto ao arsenal de substâncias desintoxicantes. Ele pode estar mais desenvolvido na virulenta HM1, que foi a cepa onde os níveis de SOD foram os mais altos, ou às diferenças entre cepas com maior virulência em inibir a produção de radicais livres pelos leucócitos.
- ✓ Mesmo em amebas isoladamente, havia superóxido e SOD, níveis mais altos de  $O_2^-$  e SOD foram obtidos com HM1.
- ✓ A melatonina interferiu nas interações entre amebas e leucócitos *in vitro*. Ela aumentou a taxa de aderência de leucócitos às amebas HM1; a morte de amebas das cepas HM1 e ICB-32 durante as interações com leucócitos foram maiores em presença de melatonina. Quanto ao estresse oxidativo, a melatonina também provocou alterações, havendo maior concentração de superóxido nas incubações de amebas HM1 tanto com MN, quanto com PMN, em presença de melatonina. E os níveis de SOD, em presença de melatonina, foram altos para HM1 e ICB-32, especialmente com PMN.

- ✓ Considerando os diferentes parâmetros analisados *in vitro*, é possível afirmar que, HM1 de *E. histolytica*, teve características e comportamentos diferentes das cepas avirulentas, o que está de acordo com a forma clínica das quais essas amebas foram isoladas, confirmando, através de outros meios, a sua virulência.
- ✓ Na amebíase experimental a melatonina não foi capaz de reduzir significativamente as lesões hepáticas dos hamsters segundo critérios macroscópicos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABBAS; LICHTMAN; POBER, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª ed Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

AKBAR, M. A.; CHATTERJEE, N. S.; SEN, P.; DEBNATH, A.; PAL, A.; BERA, T.; DAS, P. Genes induced by a high oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.133, p.187–196, 2004.

ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, p.218-24, 1993.

ANDRA, J.; HERBST, R.; LEIPPE, M. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. **Developmental and Comparative Immunology**, v.27, p.291-304, 2003.

ANKRI, S. Strategies of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* to evade the innate immune responses of intestinal epithelial cells. **Journal Bioscience**, v. 27, p.609-614, 2002.

ANTON-TAY, F.; DIAZ, J. L.; FERNANDEZ-GUARDIOLA, A. On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. **Life Sciences**, v. 10, p.841-850, 1971.

ARBO, A.; HOEFSLOOT, M.; RAMIREZ, A.; IGNACIO-SANTOS, *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. **Archivos de Investigación Médica**, v.21, p.57-61, 1990.

---

\* ABNT (NBR – 6023/2002)



ARENDRT, J.; ALDHOUS, J.; ENGLISH, J.; MARKS, V.; ARENT J.H. Some effects of jet lag and their alleviation by melatonin. **Ergonomics**, v. 30, p.1379-93, 1987.

AVUNDUK, A. M.; AVUNDUK, M. C.; BALTACI, A. K.; MOĞULKOÇ, R. Effect of melatonin and zinc on the immune response in experimental *Toxoplasma* retinochoroiditis. **Ophthalmologica**, v.221, p.421-425, 2007.

BABIOR, B. M. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. **New England Journal Medicine**, v.298, p.659, 1978.

BALTACI, A. K.; BEDIZ, C. S.; MOGULKOC, R.; KURTOGLU, E.; PEKEL A. Effect of zinc and melatonin supplementation on cellular immunity in rats with toxoplasmosis. **Biological Trace Element Research**, v.96, p.237-245, 2003.

BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R.; BEDIZ, C. S.; PEKEL, A. Effects of zinc deficiency and pinealectomy on cellular immunity in rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Biological Trace Element Research**, v.104, p.47-56, 2005.

BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R.; TURKOZ, Y.; BEDIZ, C. S.; OZUGURLU, F. The effect of pinealectomy and zinc deficiency on nitric oxide levels in rats with induced *Toxoplasma gondii* infection. **Swiss Medical Weekly**, v.134, p.359-363, 2004.

BARNES, P. F.; DECOCK, K. M.; REYNOLDS, T. N.; RALLS, P. W. A comparison of amebic and pyogenic abscess of the liver. **Medicine**, v.66, p. 472-483, 1987.

BARRIGA, C.; MARTIN, M. I.; TABLA, R.; ORTEGA, E.; RODRIGUEZ, A. B. Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress. **Journal of Pineal Research**, v.30, p.180-187, 2001.

BATISTA, E. J.; SOUZA, W. Involvement of protein kinases on the process of erythrophagocytis by *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.28, p.243-248, 2004.

BLESSMANN J.; VAN-LINH, P.; NU, P. A.; THI, H. D.; MULLER-MYHSOK, B.; BUSS, H.; TANNICH, E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.578-583, 2002.

BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; LEIPPE, M.; MIRELMAN, D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. **Molecular Microbiology**, v. 34, p.463-472, 1999.

BELLINATI-PIRES, R.; MELKI, S. E.; COLLETO, G. M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Evaluation of a fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions. **Journal of Immunological Methods**, v.119, p.189-96, 1989.

BEN-NATHAN, D.; MAESTRONI, G. J.; LUSTIG, S.; CONTI, A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. **Archives of Virology**, v.140, p.223-30, 1995.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology Today**, v.15, p.504-11, 1994.

BLAZQUEZ, S.; ZIMMER, C.; GUIGON, G.; OLIVO-MARIN, J. C.; GUILLEN, N.; LABRUYERE, E. Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, v. 74, p.1407-1411, 2006.

BOETTNER, D. R.; HUSTON, C. D.; SULLIVAN, J. A.; PETRI, W. A. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. **Infection and Immunity**, v.73, p.3422-3430, 2005.

BRUCHHAUS, I.; RICHTER, S.; TANNICH, E. Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Biochemical Journal**, v.330, p.1217-1221,1998.

BRUCKER, D. A. Amebiasis. **Clinical Microbiology Review**, v.5, p.356-369, 1992.

BRUMPT, E. Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n.sp. amibe akkystes quadrinuclees, parasite de l'homme. **Bulletin of the Academy of Medicine**, v.94, p.942-952, 1925.

BUDU, A.; PERES, R.; BUENO, V. B.; CATALANI, L. H.; GARCIA, C. R. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.261-266, 2007.

BURCH, D. J.; LI, E.; REED, S.; JACKSON, T. F. H. G.; STANLEY-JR, S. L. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.696-701, 1991.

CABALLERO, B.; VEGA-NAREDO, I.; SIERRA, V.; HUIDOBRO-FERNÁNDEZ, C.; SORIA-VALLES, C.; GONZALO-CALVO, D.; TOLIVIA, D.; PALLÁS, M.; CAMINS, A.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J.; COTO-MONTES, A. Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.106-114, 2009.

CABRERA, E.; VELERT, M. M.; ORERO, A.; MARTÍNEZ, P.; CANTÓN, E. Effect of anti-inflammatory drugs, alone and combined with ofloxacin, on the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. **Revista Española de Quimioterapia**, v.14, p.165-171, 2001.

CARDINALI, D. P.; ESQUIFINO, A. I.; SRINIVASAN V.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin and the immune system in aging. **Neuroimmunomodulation**, v.15, p.272-278, 2008.

CHAN, K. W.; SLOTBOOM, D. J.; COX, S.; EMBLEY, T. M.; FABRE, O.; VAN-DER-GIEZEN, M.; HARDING, M.; HORNER, D. S.; KUNJI, E. R.; LEON-AVILA, G.; TOVAR, J. A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. **Current Biology**, v.26, p.737-742, 2005.

CHEN, J.; HUANG, X.; LIU, Y.; DAI, G.; CHEN, W. Detoxicating enzymes of *Entamoeba histolytica* and their detoxifying roles. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v.109, p.792-794, 1996.

CIPOLLA-NETO, J.; MARQUES, M. N.; MENA-BARRETO, L. S. Ritmos hormonais. In: **Introdução ao Estudo da Cronobiologia**, 1ª ed. São Paulo: Ícones Editora, p.29-50, 1988.

CLARK, I. A.; HUNT, N. H.; COWDEN, W. B. Oxygen derived free radicals in the pathogenesis of parasitic diseases. **Advances in Parasitology**, v.25, p.71-73, 1986.

COS, S.; FERNÁNDEZ, R.; GUEZMES, A.; SÁNCHEZ-BARCELO, E. J. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Research**, v.58, p.4383-4390, 1998.

COSTA, A. O.; GOMES, M. A.; ROCHA, O. A.; SILVA, E. F. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.245-250, 2006.

COSTA, C. A.; BRITO, K. N.; GOMES, M. A.; CALIARI, M. V. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. **Parasite**, v.14, p.329-334, 2007.

COUNCILMAN, W. T.; LAFLEUR, H. A. Amoebic dysentery. **Bulletin of the Johns Hopkins hospital**, v.2, p.395-548, 1891.

CRAIG, C. F. Observations upon amoebas infecting the human intestine, with a description of two species. *Entamoeba coli* and *Entamoeba dysenteriae*. **American Medicine (Philadelphia)**, 1905.

CRAPO, L. The mysterious pine cone. In: **Hormones – the messengers of life**. Copyright, USA, p. 77-92, 1985.

CRISOSTOMO-VAZQUEZ, M. P.; CERVANTES-CERVANTES, M. P.; JIMENEZ-CARDOSO, E.; MUNOZ-SANCHEZ, J. L. Relationship between free radicals produced by *Entamoeba histolytica* and its proteases complex activity. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.44, p.79-82, 2002.

CROUCH, R. K; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M, BUSE, M.G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.

DE-LA-ROCHA, N.; ROTELLI, A.; AGUILAR, C. F.; PELZER, L. Structural basis of the anti-inflammatory activity of melatonin. **Arzneimittelforschung**, v.57, p.782-786, 2007.

DE-LA-TORRE, M.; DE-LA-HOZ, R.; LANDA, L.; SEPULVEDA, B. Cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*. **Archivos de Investigación Médica**, v.2, p.165-169, 1971.

DIAMOND, L. S.; CLARK, C. G. A redescription of *Entamoeba histolytica* shaudin, 1903 separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **The Journal of Eukaryotic microbiology**, v.40, p.340-344, 1993.

DIAMOND, L. S.; CLARK, C. G.; CUNNICK, C. C. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.42, p.277-278, 1995.

DIAMOND, L. S.; HARLOW, D. R.; CUNNICK, C. C. A new medium of the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p. 431-432, 1978.

DIAMOND, L. S.; PHILLIPS, B. P.; BARTIGIS, I. L. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* in hamster liver. **Archivos de Investigación Médica**, v.5, p.423-426, 1974.

DIAMOND, L. S.; PHILLIPS, B. P.; BARTGIS, I. L. The clawed jird (*Meriones unguiculatus*) as an experimental animal for the study of hepatic amebiasis. **Archivos de Investigación Médica (Mex)**, v.5, p.465-470, 1974.

DICKSON-GONZALEZ, S. M.; DE-URIBE, M. L.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Polymorphonuclear Neutrophil Infiltration Intensity as Consequence of *Entamoeba histolytica* Density in Amebic Colitis. **Surgical infections**, v.2, 2008.

DZERZHYSKY, M. E.; GORELIKOVA, O. I.; PUSTOVALOV, A. S. The interaction of the thyroid gland, pineal gland and immune system in chicken. **Reproductive biology**, v.6, p.79-85, 2006.

EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v.118, p.3-4, 1991.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.31, p. 9-20, 1993.

ELSAYED, N. M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. **Nutrition**, v.17, p.828-34, 2001.

EL-SOKKARY, G. H.; OMAR, H. M.; HASSANEIN, A. F.; CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, p.319-32, 2002.

FRANÇA, E. L. **Ativação de fagócitos do sangue periférico pelo *Paracoccidioides brasiliensis* e pela *Escherichia coli* enteropatogênica. Produção do ânion superóxido e modulação pelo hormônio melatonina.** Botucatu, 1997. [Dissertação de Mestrado – Departamento de Doenças Infecciosas e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista].

FRANÇA, E. L. **Imunomodulação dos fagócitos do colostro humano.** São Paulo, 2002. [Tese de Doutorado – Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112, 1995.

FURST, C.; GOMES, M. A.; TAFURI, W. L.; SILVA, E. F. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. **Pathologica**, v.94, p.22-27, 2002.

GALVÁN-MOROYOQUI, J. M.; DOMÍNGUEZ-ROBLES M. D. C.; FRANCO, E.; MEZA, I. The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, p.266, 2008.



GANDHI, B. M.; ACHARYA, S. K.; IRSHAD, M.; GUPTA, H.; CHAWLA, T. C.; TANDON, B. N. *Entamoeba histolytica*: elevated nitroblue tetrazolium reduction activity in polymorphs during amoebic liver abscess. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, p.283-285, 1987.

GARCÍA-MAURIÑO, S.; GONZÁLEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SÁNCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; AND GUERRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN $\gamma$  production by human circulating CD4<sup>+</sup> cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **Journal of Immunology**, v.159, p.574-581, 1997.

GHADIRIAN, E.; DENIS, M. *In vivo* activation of macrophages by IFN-gamma to kill *Entamoeba histolytica* trophozoites *in vitro*. **Parasite Immunology**, v.14, p.397-404, 1992.

GHADIRIAN, E.; KONGSHAVN, P. A. Activation of macrophages by *Entamoeba histolytica* extracts in mice. **Microbial Pathogenesis**, v.5, p.63-70, 1988.

GOMES, M. A.; MARTINS, M. S.; COSTA, A. O.; SILVA, E. F. Influence of bacteria upon cytopathic effect and erythrophagocytosis of different axenic strains of *Entamoeba histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, p.197-100, 1995.

GOMES, M. A.; MELO, M. N.; PENA, G. P. M.; SILVA, E. F. Virulence parameters in the characterization of strains of *Entamoeba histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p.65-69, 1997.

GOMES, M. A.; PESQUERO, J. B.; FURST, C.; VALLE, P. R.; PESQUERO, J. L.; SILVA, E. F. An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Parasitology**, v.119, p.359-362, 1999.

GONZÁLEZ, A.; MONTEERRUBIO, D.; NEQUIZ, M.; LÓPEZ, R.; OLIVOS, A.; GARCÍA-DE-LÉON, C.; TELLO, E.; SALAIZA, N.; RAMOS, E.; GUDIÑO, M.; MONTFORT, I.; PÉREZ-TAMAYO, R. Localization of *Entamoeba histolytica* amebopore in amebic liver abscesses in hamsters. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.375-379, 2008.

GUERRANT, R. L.; BRUSH, J.; RAVDIN, J. I.; SULLIVAN, J. A.; MANDELL, G. L. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v.143, p.83-93, 1981.

GUTIERREZ-ALARCON, A.; MOGUEL-TORRES, M.; MATA-LEYVA, O.; CUELLAR-NEVAREZ, G.; SIQUEIROS-CENDON, T.; EROSA, G.; RAMOS-MARTINEZ, E.; TALAMAS-ROHANA, P.; SANCHEZ-RAMIREZ, B. *Entamoeba histolytica*: Inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. **Experimental Parasitology**, v.114, p.154-159, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.246, p.501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2ed. New York: Oxford, 1996.

HAQUE, R.; ALI, I. K.; AKTHER, S.; PETRI JR. W. A. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.449-452, 1998.

HAQUE, R.; NEVILLE, L. M.; WOOD, S.; PETRI Jr., W. A. Short report detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* directly in stool. **American Jjournal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, p.595-596, 1994.

HAQUE, R.; HUSTON, C. D.; HUGHES, M.; HOUPPT, E.; PETRI , W. A. Amebiasis. **The New England Journal of Medicine**, v.48, p.1565-1573, 2003.

HILL, D. R.; PEARSON, R. D. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v.55, p.3155-61, 1987.

HONÓRIO, A. C. **Atividade bactericida dos fagócitos do colostro humano para a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**. São Paulo, 1995. [Dissertação de Mestrado – Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; LAUNAY, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MONTEIRO, R. C. Colostral neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA. **Journal of Leukocyte Biology**, v.69, p.289-296, 2001.

HOTTA, C. T. ; MARKUS, R. P. ; GARCIA, C. R. Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.36, p.1583-1587, 2003.

ILBEY, Y.O.; OZBEK, E.; CEKMEN, M.; SOMAY, A.; OZCAN, L.; OTÜNCTEMUR, A.; SIMSEK, A.; METE F. Melatonin prevents acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. **International Urology and Nephrology**, 2009.

JACOB, M. J. The integrated antioxidants systems. **Nutrition Research**, v.15, p.755-765, 1985.

JAMES, S. P.; SACK, D. A.; ROSENTHAL, N. E.; MENDELSON, W. B. Melatonin administration and insomnia. **Neuro-psychopharmacology**, v.3, p.19-23, 1990.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JARUMILINTA, R.; KRADOLFER, F. The toxic effect of *Entamoeba histolytica* on leucocytes. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.58, p.375-381, 1964.

KATZWINKEL-WLADARSCH, S.; LOSCHER, T.; RINDER, H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from specimens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, p.115-118, 1994.

KLUPINSKA, G.; CHOJNACKI, C.; HARASIUK, A.; STEPIEN, A.; WICHAN, P.; STEC-MICHALSKA, K.; Nocturnal secretion of melatonin in subjects with asymptomatic and symptomatic *Helicobacter pylori* infection. **Polski Merkurusz Lekarski**, v.21, p.239-42, 2006.

KÖCH, R.; GRAFFKI, G. Bericht über die Thatigkeit der zur Erforschung der Cholera in Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission Arb. A.d. **Kaiserf Gesundherstsamte**, 1887.

KÖNIG, T.; SCHUBERTH, H. J.; LEIBOLD, W.; ZERBE, H. Dexamethasone depresses the expression of L-selectin but not the *in vivo* migration of bovine neutrophils into the uterus. **Theriogenology**, v.65, p.1227-1241, 2006.

KORKMAZ, A.; REITER, R. J.; TOPAL, T.; MANCHESTER, L. C.; OTER, S.; TAN, D. X. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. **Molecular Medicine**, v.15, p.43-50, 2008.

KRETSCHMER, R.; RICO, G.; GIMÉNEZ, J. A. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.112, p.201-209, 2001.

KUHLWEIN, E.; IRWIN, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. **Journal of Neuroimmunology**, v.117, p.51-57, 2001.

LEIPPE, M.; MULLER-EBERHARD, H. J. The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. **Toxicology**, v.87, p.5-18, 1994.

LEJEUNE, M.; RYBICKA, J. M.; CHADEE, K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. **Future Microbiology**, v.4, p. 105-118, 2009.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; MORI, W.; WRIGHT, M. R. Melatonin in peripheral nerve. **Nature**, v.27, p.1821, 1959.

LERNER, A. B.; CASE, J. D. Melatonin. **Federation Proceedings**, v.19, p.590-592, 1960.

LIEBMANN, P. M.; WOLFLER, A.; FELSNER, P.; HOFER, D.; SCHAUENSTEIN, K. Melatonin and the immune system. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.112, p.203-211, 1997.

LIN, J. Y.; CHADEE, K.; BRUCHHAUS, I.; JACOBS, T.; LEIPPE, M.; TANNICH, E. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v.148, p.3999-4005, 1992.

LIN, J. Y.; KELLER, K.; CHADEE, K. *Entamoeba histolytica* proteins modulate the respiratory burst potential by murine macrophages. **Immunology**, v.78, p.291-297, 1993.

LISSONI, P.; BRIVIO, O.; BRIVIO, F.; BARNI, S.; TANCINI, G.; CRIPPA, D.; MEREGALLI, S. Adjuvant therapy with the pineal hormone melatonin in patients with lymph node relapse due to malignant melanoma. **Journal of Pineal Research**, v.21, p.239-242, 1996.

LO, H.; REEVES, R. E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.2, p.23-30, 1980.

LÖSCH, F. Massenhafte entwicklung von amoeben im dickdarm. **Virchows Archiv Klinische Medicin**, v.65, p.196-211, 1875.

MACFARLANE, J. G.; CLEGHORN, J. M.; BROWN, G. M.; STREINER D. L. The effect of exogenous melatonin on total sleep time and daytime alertness of chronic insomniacs: a preliminary study. **Biological Psychiatry**, v.30, p.371-376, 1991.

MAK, J. W. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. **Tropical Biomedicine**, v.21, p.39-50, 2004.

MALDONADO-BERNAL, C.; KIRSCHNING, C. J.; ROSENSTEIN, Y.; ROCHA, L. M.; RIOS-SARABIA, N.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; BECKER, I.; ESTRADA, I.; SALAZAR-GONZALEZ, R. M.; LOPEZ-MACIAS, C.; WAGNER, H.; SANCHEZ, J.; ISIBASI, A. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. **Parasite Immunology**, v.27, p.127-37, 2005.

MANRIQUE, O. R.; ROMERO, H. U.; BARRIOS, M. H.; MUÑOZ, J. F. Evaluación de la actividad de polimorfonucleares neutrófilos frente a antígenos de cepas patógenas de *Entamoeba histolytica*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.54, p.96-10, 2002.

MASANA, M. I.; DUBOCOVICH, M. L.; Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Science's STKE**, v.6, p.39, 2001.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; TAN, D. X.; HARDELAND, R.; LEON, J.; RODRIGUEZ, C.; REITER, R. J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v.165, p.139-49, 2005.

MCCOY, J. J.; MANN, B. J.; PETRI, W. A. J. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. **Infection and Immunity**, v.62, p.3045-3050, 1994.

MEHLOTRA, R. K. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. **Critical Reviews in Microbiology**, v.22, p.295-314, 1996.

MELO, M. C. B.; KLEM, V. G. Q; MOTA, J. A. C.; PENNA, F. J. Parasitoses Intestinais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.14, p.3-12, 2004.

MIRELMAN, D.; FEINGOLD, C.; WEXLER, A.; BRACHA, R. Interactions between *Entamoeba histolytica*, bacteria and intestinal cells. **Ciba Foundation Symposium**, v.99, p.2-30, 1983.

MITRA, B. N.; YASUDA, T.; KOBAYASHI, S.; SAITO-NAKANO, Y.; NOZAKI, T. Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.62, p.84-99, 2005.

MIYATA, M.; AJIMA, H.; KONDO, Y.; KANNO, T.; ITO, M.; NAKAHATA, N.; KASUKAWA, R. Concomitant use of prostaglandin E1 and prednisolone; inhibition of



superoxide anion production by polymorphonuclear leucocytes. **Fukushima Journal of Medical Science**, v.41, p.15-18, 1995.

MONCADA, D.; KELLER, K.; ANKRI, S.; MIRELMAN, D.; CHADEE, K. Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. **Gastroenterology**, v.130, p.721-30, 2006.

MORREY, K. M.; MCLACHLAN, J. A.; SERKIN, C. D.; BAKOUCHE, O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. **Journal of Immunology**, v.153, p.2671-2680, 1994.

MUNDI, H.; BJORKSTEN, B.; SVANGORG, C.; OHMAN, L.; DAHLGREN, C. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. **Infection and Immunity**, v.59, p.4168-4172, 1991.

MUNOZ-SANCHEZ, J. L.; JIMENEZ-CARDOSO, E.; CERVANTES-CERVANTES, P.; CRISOSTOMO-VAZQUEZ, M. P. Oxygen free radicals produced by *Entamoeba histolytica* are able to cause biological damage. **Archives of Medical Research**, v.28, p.154-155, 1997.

MURRAY, H. W.; ALEY, S. B.; SCOTT, W. A. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.3, p.381-391, 1981.

MUZAFFAR, J.; MADAN, K.; SHARMA, M. P.; KAR, P. Randomized, single-blind, placebo-controlled multicenter trial to compare the efficacy and safety of

metronidazole and satranidazole in patients with amebic liver abscess. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, p.2270-2273, 2006.

NISBET, D. J.; EDRINGTON, T. S.; MCREYNOLDS, J. L.; CALLAWAY, T. R.; BYRD, J. A. Influence of exogenous melatonin administration on *Salmonella enteritidis* colonization in molted layers. **Poultry Science**, v.87, p.1083-1088, 2008.

OKADA, M.; HUSTON, C. D.; MANN, B. J.; PETRI, WA, J. R.; KITA, K.; NOZAKI, T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Eukaryotic Cell**, v.4, p.827-831, 2005.

PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W, Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. **Integrative Cancer Therapies**, v.7, p.189-203, 2008.

PAPAVRAMIDIS, T. S.; SAPALIDIS, K.; PAPPAS, D.; KARAGIANOPOULOU, G.; TRIKOUPI, A.; SOULEIMANIS, C. H.; PAPAVRAMIDIS, S. Gigantic hepatic amebic abscess presenting as acute abdomen: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v.2, p.325, 2008.

PAREDES, S. D.; SANCHEZ, S.; PARVE,Z H.; RODRIGUEZ, A. B.; BARRIGA, C. Altered circadian rhythms of corticosterone, melatonin, and phagocytic activity in response to stress in rats. **Neuro Endocrinology letters**, v.28, p.489-495, 2007.

PENA, C.; RINCON, J.; PEDREANEZ, A.; VIERA, N.; MOSQUERA, J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.263-269, 2007.

PÉREZ, M. R.; KRETSCHMER, R. R. Respuesta de inmunidad humoral. In: KRETSCHMER, R. R. **Amibiasis Infección y Enfermedad**. México, DF. Editorial Trillas, 1994.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v.46, p.211-26, 1981.

PIERPAOLI, W.; MAESTRONE, G. J. M. Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its anti-aging effects. **Immunology Letters**, v.16, p.355-62, 1987.

PILLAI, D. R.; KOBAYASHI, S.; KAIN, K. C. *Entamoeba dispar*: molecular characterization of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. **Experimental Parasitology**, v.99, p.226-234, 2001.

PIMENTA, P. F.; DIAMOND, L. S.; MIRELMAN, D. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: differences in their cell surfaces and in the bacteria-containing vacuoles. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, p.209-19, 2002.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 41, p. 136-141, 2006.

PORTH, C. M. **Fisiopatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PRITT, B. S.; CLARK, C. G. Amebiasis. **Mayo Clinic Proceedings**, v.83, p.1154-1159, 2008.

PYSOVA, I.; TUMOVA, P.; TOLAROVA, V.; NOHYNKOVA, E. Nonpathogenic *Entamoeba dispar* quickly outgrows pathogenic *Entamoeba histolytica* in mixed xenic cultures. **Letters in Applied Microbiology**, 2009.

QUE, X.; BRINEN, L. S.; PERKINS, P.; HERDMAN, S.;HIRATA, K.; TORIAN, B. E.; RUBIN, H.; MCKERROW, J. H.; REED, S. L. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.119, p.23-32, 2002.

QUE, X.; REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Journal of Clinical Microbiology Review**, v.13, p.196–206, 2000.

RADOGNA, F.; PATERNOSTER, L.; DE-NICOLA, M.; CERELLA, C.; AMMENDOLA, S.; BEDINI, A.; TARZIA, G.; AQUILANO, K.; CIRIOLO, M.; GHIBELLI, L. Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.19, 2009.

RAHMAN, M. A.; AZUMA, Y.; FUKUNAGA, H.; MURAKAMI, T.; SUGI, K.; FUKUSHI, H.; MIURA, K.; SUZUKI, H.; SHIRAI, M. Serotonin and melatonin, neurohormones for homeostasis, as novel inhibitors of infections by the intracellular parasite chlamydia. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.861-868, 2005.

RAMOS-MARTÍNEZ, E.; OLIVOS-GARCÍA, A.; SAAVEDRA, E.; NEQUIZ, M.; SÁNCHEZ, E. C.; TELLO, E.; EL-HAFIDI, M.; SARALEGUI, A.; PINEDA, E.;

DELGADO, J.; MONTFORT, I.; PÉREZ-TAMAYO, R. *Entamoeba histolytica*: Oxygen resistance and virulence. **International Journal for Parasitology**, 2008.

RAVDIN, J. I. Amebiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.1453-64, 1995.

RAVDIN, J. I.; MURPHY, C. F. Characterization of the galactose-specific binding activity of a purified soluble *Entamoeba histolytica* adherence lectin. **Journal of Protozoology**, v.39, p.319-23, 1992.

REITER, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.79, p.153-158, 1991.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, v.56, p.359-384, 1998.

REITER, R. J. The ageing pineal gland and its physiological consequences. **Bioessays**, v.14 p.169-75, 1992.

REITER, R. J.; KORKMAZ, A. Clinical aspects of melatonin. **Saudi Medical Journal**, v.29, p.1537-1547, 2008.

REPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Melatonin madness. **Cell**, v.83, p.1059-1062, 1995.

RICO, G.; DÍAZ, O.; GIMÉNEZ, J. A.; KRETSCHMER, R. Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. **Archives of Medical Research**, v.23, p.157-159, 1992.

SALATA, R. A.; PEARSON, R. D.; RAVDIN, J. I. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. **Journal of Clinical Investigation**, v.76, p.491-499, 1985.

SANCHEZ, S.; PAREDES, S. D.; SANCHEZ, C. L.; BARRIGA, C.; REITER, R. J.; RODRIGUEZ, A. B. Tryptophan administration in rats enhances phagocytic function and reduces oxidative metabolism. **Neuro Endocrinology Letters**, v.29, p.1026-1032, 2008.

SANCHEZ-GUILLEN, M. C.; PEREZ-FUENTES, R.; SALGADO-ROSAS, H.; RUIZ-ARGUELLES, A.; ACKERS, J.; SHIRE, A.; TALAMAS-ROHANA, P. Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.731-737, 2002.

SANTELLO, F. H.; FRARE, E. O.; CAETANO, L. C.; ALONSOTOLDO, M. P.; DO-PRADO J. C. JR. Melatonin enhances pro-inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. **Journal of Pineal Research**, v.45, p.79-85, 2008.

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

SANTI-ROCCA, J.; RIGOTHIER, M. C.; GUILLÉN, N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.65-75, 2009.

SARGEAUNT, P. G.; WILLIAMS, J. E.; GREENE, J. D. The differentiation of invasive and non-invasive *E. histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p.519-521, 1978.

SCHAIN, D. C.; SALATA, R. A.; RAVDIN, J. I. Human T-lymphocytes proliferation lymphokine production and amoebic activity elicited by the galactose-inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, v.60, p.2143-2146, 1992.

SCHAUDINN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. **Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte**, v.19, p.547-576, 1903.

SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Urinary melatonin levels and postmenopausal breast cancer risk in the nurses' health study cohort. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.18, p.74-79, 2009.

SEGAL, A. W.; SOOTHILL, J. F. Phagocytes. In: SOOTHILL, J. F. **Pediatric Immunology**. Oxford: Blackweel, 1983.

SEN, A.; CHATTERJEE, N. S.; AKBAR, M. A.; NANDI, N. P. The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress. **Eukaryotic Cell**, v.6, p.664-673, 2007.

SEYDEL, K. B.; SMITH, S. J.; STANLEY, S. L. J.; BRUCHHAUS, I.; JACOBS, T.; LEIPPE, M.; TANNICH, E. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. **Infection and Immunity**, v.68, p.400-402, 2000.

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

SILVA, E. F. ***Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade**. Belo Horizonte, 1997. [Tese de Doutorado – Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais].

SILVA, E. F.; GOMES, M. A. Amebíase. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

SILVA E. F.; GOMES, M. A.; BARRAL-DE-MARTINEZ A. M. *Entamoeba histolytica*: Axenization and characterization of isolated samples from asymptomatic and symptomatic patients from different regions of Brazil. **Archives of Medical Research**, v.28, p.88-89, 1997.

SILVA-GARCIA, R.; RICO-ROSILLO, G.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTANON, G.; GIMENEZ-SCHERER, J.; KRETSCHMER, R. *Entamoeba dispar* does not produce the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica*. **Parasite Immunology**, v.25, p.99-101, 2003.

SPREER, A, GERBER, J, BAAKE, D, HANSEN, M, HUETHER, G, NAU, R. Antiinflammatory but no neuroprotective effects of melatonin under clinical treatment conditions in rabbit models of bacterial meningitis. **Journal of Neuroscience research**, v.84, p.1575-1579, 2006.



SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; CARDINALI, D. P. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms.

**Integrative Cancer Therapies**, v.7, p.189-203, 2008.

SRIVASTAVA, S.; BHATTACHARYA, S.; PAUL J. Species and strain-specific probes derived from repetitive DNA for distinguishing *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Experimental Parasitology**, v.110, p.303-308, 2005.

STANLEY-JR, S. L. Amoebiasis. **Lancet**, v.22, p.1025-1034, 2003.

STANLEY-JR, S. L. Pathophysiology of amoebiasis. **Trends in Parasitology**, v.17, p.280-285, 2001.

SUÁREZ-ARTACHO, G.; OLANO-ACOSTA, M. C.; VÁZQUEZ-MONCHUL, J.; SOUSA-VAQUERO, J. M.; SOCAS-MACÍAS, M.; MENDOZA-GARCÍA, E. Acute fulminant colitis caused by intestinal amebiasis. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v.98, p.559-560, 2006.

TAKAHASHI, T.; GAMBOA-DOMINGUEZ, A.; GOMEZ-MENDEZ, T. J.; REMES, J. M.; REMBIS, V.; MARTINEZ-GONZALEZ,, D.; GUTIERREZ-SALDIVAR, J.; MORALES, J. C.; GRANADOS, J.; SIERRA-MADERO, J. Fulminant amebic colitis: analysis of 55 cases. **Diseases of the Colon and Rectum**, v.40, p.1362-1367, 1997.

TANI, K.; MURPHY, W. J.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific IG production in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, p.971-976, 2001.

TANIMOTO-WEKI, M.; CALDERÓN, P.; DE-LA-HOZ, R.; AGUIRRE-GARCÍA, J. Inoculation of *Entamoeba histolytica* into hamsters under the effect of immunosuppressive drugs. **Archivos de Investigación Médica**, v.5, p.441-446, 1974.

TANNICH, E.; HORSTMANN, R. D.; KNOBLOCH, J.; ARNOLD, H. H. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.5118-5122, 1989.

TANYUKSEL, M.; PETRI-JR, W. A. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.713-729, 2003.

THOMPSON, J. E. JR.; FORLENZA, S.; VERMA, R. Amebic liver abscess: a therapeutic approach. **Reviews of Infectious Diseases**, v.7, p.171-179, 1985.

TOWNSON, S. M.; BOREHAM, P. F.; UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Tropica**, v.56, p.173-94, 1994.

TRISSEL, D.; MARTINEZ-PALOMO, A.; DE-LA-TORRE, M.; DE-LA-HOZ, R.; PEREZ, S. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **Journal of Experimental Medicine**, v.148, p.1137-1143, 1978.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, v.78, p.687-721, 1998.

VAN-HAL, S. J.; STARK D. J.; FOTEDAR, R.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. T.; HARKNESS, J. L. Amoebiasis: current status in Australia. **The Medical Journal of Australia**, v.186, p.412-416, 2007.

VINAYAK, V. K.; SAWHNEY, S.; JAIN, P.; CHUGH, S.; CHAKRAVARTI, R. N. Immunosuppression and experimental amoebiasis in guinea-pigs. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.76, p.309-316, 1982.

VINAYAK, V. K.; SAXENA, A.; JOSHI, K. Interactions of macrophages from *in vivo* stimulated guineapigs & the trophozoites of *Entamoeba histolytica*. **The Indian Journal of Medical Research**, v.91, p.33-38, 1990.

VOIGT, H.; OLIVO, J. C.; SANSONETTI, P.; GUILLEN, N. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. **Journal of Cell Science**, v.112, p.1191-1201, 1999.

WALKER, E. L. A comparative study of the amoebae in the Manila water supply, in the intestinal tract of healthy persons, and in amoebic dysentery. **Philippine Journal**, v.6, p.259, 1911.

WALSH, J. A. Amebiasis in the world. **Archivos de Investigación Médica**, v.17, p.385-389, 1986.

WANG, W.; KELLER, K.; CHADEE, K. Modulations of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. **Infection and Immunity**, v.60, p.3169-3174, 1992.

WASSMANN, C.; HELLBERG, A.; TANNICH, E.; BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p. 26051-26056, 1999.

WEINBACH, E. C.; TAKEUCHI, T.; ELWOOD-CLAGGETT, C.; INOHUE, F.; KON, H.; DIAMOND, L. S. Role of iron-sulfur proteins in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. **Archivos de Investigación Médica**, v.11, p.75-81, 1980.

WEITZMAN, E. D.; CZEILER, C. A.; COLEMAN, R. M.; SPIELMAN, A. J.; ZIMMERMAN, J. C.; DEMENT, W. C. Delayed sleep phase syndrome, a chronobiological disorder with sleep-onset insomnia. **Archives of General Psychiatry**, v.38, p.737-46, 1981.

WHO (OMS). A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. **Epidemiological Bulletin**, v.18 p. 13-14, 1997.

YAMASAKI, M.; TANIGUCHI, A.; NAGAI, M.; SASAKI, R.; NAITO, Y.; KUZUHARA, S. Probable amebic brain abscess in a homosexual man with an *Entamoeba histolytica* liver abscess. **Rinsho Shinkeigaku**, v.47, p.672-675, 2007.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-62, 1994.

ZAIDAN, R.; GEOFFRIAU, M.; BRUN, J.; TAILLARD, J.; BUREAU, C.; CHAZOT, G.; CLAUSTRAT, B. Melatonin is able to influence its secretion in humans: description of a phase-response curve. **Neuroendocrinology**, v.60, p.105-112, 1994.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1 – Modelo do Termo de Consentimento

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A aluna do programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Aline do Carmo França Botelho, convida-lhe \_\_\_\_\_ a participar como voluntário no projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da interferência da melatonina nas interações entre trofozoítos de Entamoeba e células sanguíneas” O projeto objetiva avaliar *in vitro* as interações entre trofozoítos de *E. histolytica* e células sanguíneas, bem como, a capacidade dos hormônios melatonina e cortisona de modular essas interações, aspectos ainda cientificamente obscuros, o que torna o projeto pertinente. O voluntário afirma que foi esclarecido quanto aos seguintes aspectos:

- Os objetivos da pesquisa;
- Necessidade de colheita de amostras de sangue;
- Recebimento de esclarecimentos à cerca dos procedimentos, desconfortos e riscos possíveis, resultados, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação;
- Garantia de poder retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização ou prejuízo.
- Caráter confidencial da pesquisa, não sendo permitida a identificação dos participantes.

---

**Assinatura do voluntário**

**Data**