



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**“Avaliação da atividade tripanocida do ácido gálico e seus  
ésteres contra formas epimastigotas de *Trypanosoma  
cruzi*”**

**Rogério Andréo**

Araraquara – SP

2011

ROGÉRIO ANDRÉO

Avaliação da atividade tripanocida do ácido gálico e seus ésteres contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

A559a Andréo, Rogério  
Avaliação da atividade tripanocida do ácido gálico e seus ésteres contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* / Rogério Andréo. – Araraquara : [s.n], 2011  
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli

1. Biotecnologia. 2. Citocina. 3. *Trypanosoma cruzi*.  
4. Galatos. 5. Apoptose. I. Título.

## ***DADOS CURRICULARES***

**ROGÉRIO ANDRÉO**

### **DADOS PESSOAIS**

Nascimento: 14/08/1979

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Catanduva-SP

Estado civil: Solteiro

Filiação: Antônio Sidney Andréo e Aparecida Clair Galbeiro Andréo

Profissão: Biólogo

Endereço: Rua Tiradentes nº 862, Ibitinga-SP

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

#### **Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas**

Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), concluído em 2006.

### **TRABALHOS PUBLICADOS**

IBELLI, A. M. G.; NAKATA, L. C.; ANDRÉO, R.; COUTINHO, L. L.; OLIVEIRA, M. C. S.; AMARANTE, A. F. T.; FURLONG, J.; ZAROS, L. G.; REGITANO, L. C. A. mRNA profile of Nellore calves after primary infection with *Haemonchus placei*. *Veterinary Parasitology*, 2010 (in press).

REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CARVALHO, M. E.; ANDRÉO, R.; MOREIRA, I.; NEO, T. A.; BARIONI, W. Avaliação da resitência de bovinos de diferentes grupos genéticos ao carrapato e à babesiose. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Embrapa Pecuária Sudeste)*, v. 9, p. 1-48, 2006.

## TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ANDRÉO, R.; CHIARI, B. G.; ISAAC, V. L. B.; CICALI, R. M. B. Avaliação da atividade de ésteres semi-sintéticos do ácido gálico em células tumorais. 57ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, p. 87, 2010.

SIQUEIRA, M. C.; REGASINI, L. O.; ANDRÉO, R.; VIEIRA, G. A. L.; SILVA, D. H. S.; CICALI, R. M. B. Atividade de substâncias isoladas de *Pterogyne nitens* e em sinergismo com benzonidazol em *Trypanosoma cruzi*. V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, Guarulhos, 2010.

ANDRÉO, R.; KOHATSU, A. A. N.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; ISAAC, V. L. B.; SILVA, M.; CICALI, R. M. B. Evaluation of trypanocidal and cytotoxicity activity of -alkyl esters of gallic acid in *T. cruzi* and HepG2 cells. XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXVII Annual Meeting on basic research in Chagas' Disease, Foz do Iguaçu, 2010.

ANDRÉO, R.; PETRONIO, M. S.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; CICALI, R. M. B.; SILVA, D. H. S. Immunomodulatory effects of alkyl gallates on cytokines associated with *Trypanosoma cruzi* infection. 5<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Ouro Preto, 2010.

SIQUEIRA, M. C.; REGASINI, L. O.; VIEIRA, G. A. L.; ANDRÉO, R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; CICALI, R. M. B. Cytotoxicity evaluation of *Pterogyne nitens* substances against two *Trypanosoma cruzi* strains. Anais do Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 2009.

SIQUEIRA, M. C.; REGASINI, L. O.; VIEIRA, G. A. L.; ANDRÉO, R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; CICALI, R. M. B. Cytotoxicity evaluation of *Pterogyne nitens* substances against two *Trypanosoma cruzi* strains. 56ª Jornada Farmacêutica da Unesp, Araraquara, 2009.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; BARBOSA, R. T.; ANDRÉO, R.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M. Reproductive behavior and ovarian function in nelore beef cows (*bos taurus indicus*) after induction of ovulation and treatment with gnrh and hcg. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Acta Scientia Veterinariae, Guarujá, 2008.

IBELLI, A. M. G.; NAKATA, L. C.; ANDRÉO, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. Quantificação de mRNA de genes relacionados a resposta imune em abomaso de bovinos infectados com endoparasitos *Haemonchus* spp. 44<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Jaboticabal, 2007.

IBELLI, A. M. G.; NAKATA, L. C.; ANDRÉO, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. Cytokine quantification in abomasal lymph node of bovine infected with *Haemonchus* spp parasites. 8<sup>th</sup> International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto, 2007.

IBELLI, A. M. G.; ANDRÉO, R.; COUTINHO, L. L.; GOUVEIA, J. J. S.; NAKATA, L. C.; OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A. Seleção de genes constitutivos para estudos de expressão gênica em abomaso e linfonodo abomasal de bovinos. 53<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, 2007.

SANTIAGO, A. C.; VENERONI, G. B.; ANDRÉO, R.; MEIRELLES, S. L.; OLIVEIRA, H. N.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A. Distribuição do polimorfismo da leptina em bovinos da raça Canchim. II Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2007.

ANDRÉO, R.; ALENCAR, M. M.; VENERONI, G. B.; MEIRELLES, S. L.; OLIVEIRA, H. N.; REGITANO, L. C. A. Análise de associação entre o marcador microssatélite CYP21 e espessura de gordura em bovinos da raça Canchim. I Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2006.

MOREIRA, I.; CARVALHO, M. E.; ANDRÉO, R.; GASPARIN, G.; MIYATA, M.; OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; SILVA, A. M.; REGITANO, L. C. A. Avaliação de dois marcadores microssatélites quanto a resistência ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos. I Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2006.

VENERONI, G. B.; SANTIAGO, A. C.; ANDRÉO, R.; MEIRELLES, S. L.; OLIVEIRA, H. N.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A. Associação do polimorfismo da Leptina com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim. I Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2006.

IBELLI, A. M. G.; NAKATA, L. C.; ANDRÉO, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; BIANCHIN, I.; BARBOSA, R. T.; REGITANO, L. C. A. Quantificação das citocinas IL-2, IL-8 e IL-13 em bezerros Nelore. I Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2006.

REGITANO, L. C. A.; CARVALHO, M. E.; MELETI, L. C.; ANDRÉO, R.; VENERONI, G. B.; GASPARIN, G.; MIYATA, M.; MOREIRA, I.; OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; SILVA, A. M. Caracterização molecular de bovinos cruzados 1/2 angus 1/2 nelore e 1/2 canchim 1/2 nelore. 51º Congresso brasileiro de genética, Águas de Lindoia, 2005.

REGITANO, L. C. A.; ANDRÉO, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CARVALHO, M. E.; MELETI, L. C.; GASPARIN, G.; MIYATA, M.; BARIONI, W.; SILVA, A. M. Investigação de marcadores para resistência ao carrapato em bovinos da raça nelore e seus cruzamentos. XIX Congresso da Associação Latinoamericana de Produção Animal, Tampico, 2005.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

Vitrogen – Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologias da Reprodução.

Período: Maio/2008 a Fevereiro/2009.

EMBRAPA Pecuária Sudeste – São Carlos

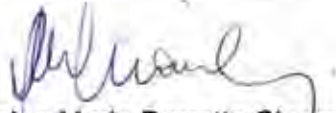
Iniciação Científica. Período: Fevereiro/2005 a Dezembro/2006.

**ROGÉRIO ANDRÉO**

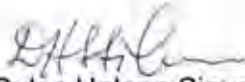
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 24 de março de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Maria Barretto Cicarelli (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dulce Helena Siqueira Silva  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Sergio de Albuquerque  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Ribeirão Preto



Dedico este trabalho a DEUS, por estar sempre ao meu lado, iluminando meus caminhos e guiando meus passos; pela fé, reforçada sempre nos momentos mais difíceis;

A toda minha família, em especial aos meus pais, pelo amor, carinho, compreensão e oportunidade de seguir até aqui;

A minha namorada pelo seu carinho e amor, pela sua dedicação, perseverança e contribuição no desenvolvimento deste trabalho, bem como a sua família, pelo apoio e compreensão;

A todos os meus amigos e colegas, os novos, adquiridos durante o desenvolvimento deste trabalho, e também aos velhos, afastados um pouco, pela distância da estrada;

A Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli, pela orientação e oportunidade tão importante para minha carreira.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Química e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP –Araraquara, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudo, à Fundação para o desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios financeiros ao projeto.

Aos docentes e funcionários do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas colaborações e ensinamentos.

À Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac, do laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, por permitir a utilização das células HepG2.

À Aline Tansini pela importante ajuda nas análises de citometria de fluxo.

À todos os amigos do laboratório de Imunologia pela amizade, companheirismo e auxílios no desenvolvimento deste trabalho.

*“Se não houver frutos, valeu a beleza das  
flores, se não houver flores, valeu a intenção  
das folhas, se não houver folhas, valeu a  
intenção da semente”*

## RESUMO

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Atualmente a doença é considerada negligenciada devido à falta de investimentos para obtenção de fármacos capazes de tratar e curar a doença com menos efeitos colaterais do que o benzonidazol, utilizado até o momento. Desta forma, a busca por novos agentes terapêuticos contra a doença de Chagas é uma estratégia importante para eliminar ou, pelo menos, diminuir a incidência desta doença debilitante e que afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas na América Latina. Neste trabalho foi avaliada a atividade tripanocida do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, assim como a citotoxicidade sobre células de mamíferos (HepG2). Informações adicionais foram obtidas sobre o perfil de produção de citocinas por macrófagos murinos não infectados e tratados com os galatos; também realizou-se o estudo do efeito apoptótico destas substâncias em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados obtidos foram bastante interessantes e animadores, uma vez que, alguns ésteres de ácido gálico apresentaram atividade tripanocida maior do que aquela observada com benzonidazol e baixa citotoxicidade em células de mamíferos. Além disso, a avaliação do perfil de produção de citocinas, induzido pelas substâncias mostrou resposta favorável à resistência do hospedeiro contra a doença de Chagas. Nos experimentos realizados para avaliar a atividade apoptótica das substâncias em *T. cruzi*, aquelas que tiveram maior atividade tripanocida apresentaram baixa taxa de apoptose, o que sugere um mecanismo de ação mais relacionado com a característica surfactante destas substâncias; por outro lado, as que apresentaram menor atividade tripanocida, e provocaram apoptose, podem estar atuando como inibidoras da biossíntese de ergosterol.

**Palavras chaves:** *Trypanosoma cruzi*. Galatos. Citometria de fluxo. MTT. Citocinas. Apoptose. Macrófagos.

## ABSTRACT

The American trypanosomiasis or Chagas disease is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi* protozoan. Currently, it is a neglected disease due to the lack of investments in order to obtain drugs able to treat and cure the disease with fewer side effects than benznidazole, used until now. Thus, the search for new therapeutic agents against Chagas disease is an important strategy to eliminate or at least reduce the incidence of this debilitating disease that affects approximately 10 million people in Latin America. In this study were evaluated the trypanocidal activity of gallic acid and its semi synthetic esters against epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*, as well as, the cytotoxicity on mammalian cells (HepG2). Additional information was obtained about the profile of cytokine production by murine macrophages uninfected treated with gallates; also it was studied the apoptotic effect of these substances in epimastigotes forms of *T. cruzi*. The results obtained were very interesting and encouraging since some esters of gallic acid showed trypanocidal activity greater than that observed with benznidazole and low cytotoxicity in mammalian cells. Moreover, the evaluation of the profile of cytokine production induced by the substances showed a favorable response to the host resistance against Chagas disease. In the experiments performed to evaluate apoptosis activity of the substances in *T. cruzi*, those who had greater trypanocidal activity, presented a low apoptosis rate, which suggests a mechanism of action based on the surfactant feature of these substances; by the other hand, the substances that showed low trypanocidal activity and caused apoptosis, can act as inhibitors of the ergosterol biosynthesis.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*. Galattes. Flow cytometry. MTT. Cytokines. Apoptosis. Macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no homem	23
Figura 2	Fórmula estrutural do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos utilizados nos ensaios	41
Figura 3	Representação gráfica da atividade tripanocida dos ésteres de ácido gálico mais ativos contra <i>T. cruzi</i>	50
Figura 4	Representação gráfica da toxicidade dos galatos sobre células metabolizadoras humanas (HepG2)	54
Figura 5	Perfil de produção da citocina IL-10	56
Figura 6	Perfil de produção da citocina TGF- $\beta$	58
Figura 7	Perfil de produção da citocina TNF- $\alpha$	60
Figura 8	Perfil de produção da citocina IFN- $\gamma$	62
Figura 9	Análise de citometria de fluxo de formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> (controles positivo e negativo).	66
Figura 10	Análise de citometria de fluxo de formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> (tratadas com galatos de heptila e nonila)	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade tripanocida, expressa em IC <sub>50</sub> , do benznidazol, ácido gálico e ésteres semi-sintéticos de ácido gálico contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	49
Tabela 2	IC <sub>50</sub> (média) das substâncias mais ativas, respectivo desvio padrão e diferença significativa entre as médias	51
Tabela 3	Toxicidade do benzonidazol e dos ésteres de ácido gálico, representado em IC <sub>50</sub> , sobre células metabolizadoras humanas (HepG2)	53
Tabela 4	Resultados de IC <sub>50</sub> em células HepG2, <i>T. cruzi</i> e resultados do índice de segurança(SI)	54
Tabela 5	Produção de IL-10 (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico	57
Tabela 6	Produção de TGF- $\beta$ (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico	59
Tabela 7	Produção de TNF- $\alpha$ (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico	61
Tabela 8	Produção de IFN- $\gamma$ (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico	63
Tabela 9	Resposta na produção de citocinas, por macrófagos murinos incubados na presença das substâncias. Os símbolos indicam aumento (+) ou diminuição (-) na produção da citocina em relação ao controle na mesma linhagem de camundongo	65

Tabela 10 Médias das taxas de apoptose de parasitos não tratados  
(controle), tratados com os galatos e com a pentamidina

66



## LISTA DE ABREVIATURAS

Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono (Gás carbônico)
Δψ	Potencial de membrana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IC <sub>50</sub>	50% da concentração inibitória
IFN-γ	Interferon-gama
IL -10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
JC-1	5, 5', 6, 6' - tetrachloro - 1, 1', 3, 3' - tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
LIT	Meio Liver Infusion Tryptose
M	Molar
MEM	Meio essencial mínimo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	óxido nítrico
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PE	Ficoeritrina
PMS	Fenazina Metasulfato
RPMI	Meio Instituto Roswell Park Memorial
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SI	<i>Safety Index</i>

TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 Histórico da Doença de Chagas	19
1.2 A Doença na atualidade	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
2.1 Doença de Chagas	22
2.2 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
2.3 Resposta imune na doença de Chagas	25
2.4 Citocinas envolvidas na doença de Chagas	26
2.5 Deficiências no tratamento da doença de Chagas	27
2.6 Produtos naturais para o tratamento da doença de Chagas	28
2.7 Importância das plantas na obtenção de matérias-primas farmacêuticas	29
2.8 Gênero <i>Alchornea</i>	29
2.9 O ácido gálico e seus ésteres	30
2.10 Avaliação da toxicidade celular	31
2.11 Avaliação de apoptose celular	31
2.12 Aplicação da citometria de fluxo	32
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>4 OBJETIVOS</b>	38
4.1 Objetivos gerais	38
4.2 Objetivos específicos	38
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	40
5.1 Moléculas	40
5.2 Parasitos	42
5.3 Camundongos	42
5.4 Linhagem celular de hepatoma humano - HepG2	42
5.5 Avaliação da atividade tripanocida (IC <sub>50</sub> ) contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo método do MTT	43
5.6 Determinação da citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) em macrófagos peritoneais de camundongos	44

5.7 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo pela técnica de exclusão do corante azul de tripan	44
5.8 Determinação da citotoxicidade das substâncias em células de hepatoma humano (HepG2)	45
5.9 Cálculo do índice de citotoxicidade (IC <sub>50</sub> )	46
5.10 Determinação do Índice de Segurança das substâncias ( <i>Safety Index – SI</i> )	46
5.11 Perfil de produção das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e TGF- $\beta$ , por macrófagos murinos incubados com os ésteres mais ativos	46
5.12 Determinação do potencial apoptótico dos ésteres de ácido gálico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	46
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
6.1 Avaliação da atividade tripanocida (IC <sub>50</sub> ) contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo método do MTT	49
6.2 Determinação da citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) em macrófagos peritoneais de camundongos	51
6.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo pela técnica de exclusão do corante azul de tripan	52
6.4 Determinação da citotoxicidade das substâncias em células de hepatoma humano (HepG2)	53
6.5 Determinação do Índice de Segurança das substâncias ( <i>Safety Index – SI</i> )	54
6.6 Perfil de produção das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e TGF- $\beta$ , por macrófagos murinos incubados com os ésteres mais ativos	55
6.7 Determinação do potencial apoptótico dos ésteres de ácido gálico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	65
<b>7 CONCLUSÃO</b>	70
<b>REFERÊNCIAS</b>	73
<b>APÊNDICES</b>	88



# Introdução

## 1.1 Histórico da Doença de Chagas

Em 1907, Carlos Chagas e sua equipe foram designados pelo então diretor do Instituto Manguinhos, Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz, para executar a campanha anti-palúdica nos serviços de construção da Estrada de ferro Central do Brasil, na região norte de Minas Gerais, onde tiveram informações da existência de um hematófago, conhecido pelos moradores da região como barbeiro e, que habitava os domicílios humanos, atacando as pessoas à noite e escondendo-se durante o dia nas frestas das paredes, nas coberturas das casas e onde pudesse encontrar abrigo (CHAGAS, 1909).

Ao examinarem o conteúdo do intestino posterior de alguns dos hematófagos capturados em Minas Gerais, encontraram numerosos flagelados, que posteriormente descobriram infectar o homem (CHAGAS, 1909).

A descoberta da infecção do homem pelo flagelado ocorreu da seguinte forma: em várias casas onde existiam barbeiros, fizeram exames de sangue nos doentes com a sintomatologia de anemia profunda, com grande decadência orgânica e, constataram em muitas crianças, sensível retardamento da evolução e, em adultos, infantilismo bem caracterizado, edemas, enfartamento ganglionar, esplenomegalia, perturbações funcionais diversas, especialmente para o sistema nervoso. O exame era feito examinando-se uma gota de sangue entre lâmina e lamínula, e estes apresentaram resultado negativo (CHAGAS, 1909).

Quatro dias depois, chamado para medicar uma criança em estado grave e cujo sangue havia também sido examinado, observou no sangue periférico, a presença de flagelados idênticos aos encontrados no intestino dos hematófagos. Após esta verificação inocularam cobaias com sangue retirado da criança por punção venosa e observaram que as cobaias morreram no sexto dia após a inoculação (CHAGAS, 1909).

As pesquisas de Chagas ainda o levaram ao descobrimento do ciclo biológico do parasito, suas formas evolutivas, suas modificações e locais onde ocorrem (CHAGAS, 1909).

## 1.2 A Doença na atualidade

Mais de um século depois de sua descoberta, a Doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada devido à falta de um medicamento eficaz para seu controle (YAMEY, 2002).

Apenas dois medicamentos são utilizados clinicamente para o tratamento da doença, o benzonidazol, um nitroimidazol, e o nifurtimox, um nitrofurano. Os dois fármacos possuem eficácia limitada durante a fase aguda e a fase crônica da doença, com 76 e 8% de cura, respectivamente (CANÇADO, 2002; FERRAZ et al., 2007) podendo ser a presença de cepas naturalmente resistentes ao benzonidazol e ao nifurtimox um importante fator que explica as baixas taxas de cura por parte de alguns dos pacientes tratados (FILARDI; BRENER, 1987; FERRAZ et al., 2007).

Pouco se sabe sobre as influências dos parâmetros relacionados com a falha terapêutica no hospedeiro. Um dos principais fatores que podem interferir com a eficácia do tratamento da doença de Chagas é a resposta imunológica do hospedeiro, juntamente com a ação do fármaco. A resposta imunológica do hospedeiro tem sido implicada na resistência à infecção, como resultado da inibição da replicação do parasito e modulação do início da infecção pelo *T. cruzi* (FERRAZ et al., 2007).

A falta de um tratamento eficaz para a doença de Chagas, evidencia a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas que sejam eficazes na quimioprofilaxia e, principalmente, na quimioterapia da doença.

São necessárias substâncias que principalmente sejam ativas na fase crônica, que é a forma predominante da doença; também, que sejam capazes de atuar em diferentes cepas do parasito e que possam substituir o nifurtimox e o benzonidazol, substâncias eficazes apenas na fase aguda, e que apresentam sérios efeitos colaterais como anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central ou sintomas maníacos, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatites (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).



Revisão  
da Literatura



### 2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença debilitante e praticamente incurável (GUEVARA et al., 2005), que afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas em todo o mundo (WORLD..., 2010). Estima-se que em 2008 a doença causou a morte de mais de 10.000 pessoas e que, aproximadamente 25 milhões, estão sob o risco de contrair a doença principalmente na América Latina, onde a doença é considerada endêmica (WORLD..., 2010).

A doença é reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (HOTEZ et al., 2007). Tem sido um flagelo para a humanidade desde a antiguidade, e continua a ser um relevante problema social e econômico em muitos países da América Latina (MATHERS et al., 2007; MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Esta infecção, também conhecida como Tripanosomíase Americana, é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, e foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) (CHAGAS, 1909; RASSI Jr. et al., 2010).

O relato original de Chagas (CHAGAS, 1909) é único na história da medicina, no sentido de que um único cientista descreveu em detalhes tanto o ciclo de transmissão (vetores, hospedeiros, e o organismo infeccioso) e as manifestações clínicas agudas do primeiro caso humano (RASSI Jr. et al., 2010).

Resultados de estudos de paleoparasitologia que recuperaram DNA de *T. cruzi* de múmias humanas mostraram que a doença de Chagas atinge o homem há mais de 9000 anos (AUFDERHEIDE et al., 2004). Notavelmente, o primeiro caso relatado da doença de Chagas pode ter precedido a descoberta de Carlos Chagas; Charles Darwin possivelmente contraiu infecção por *T. cruzi* durante a sua expedição à América do Sul em 1835, como sugerido por sua vívida descrição de contato com o barbeiro, triatomíneo, e por alguns de seus sintomas na vida adulta (BERNSTEIN, 1984).

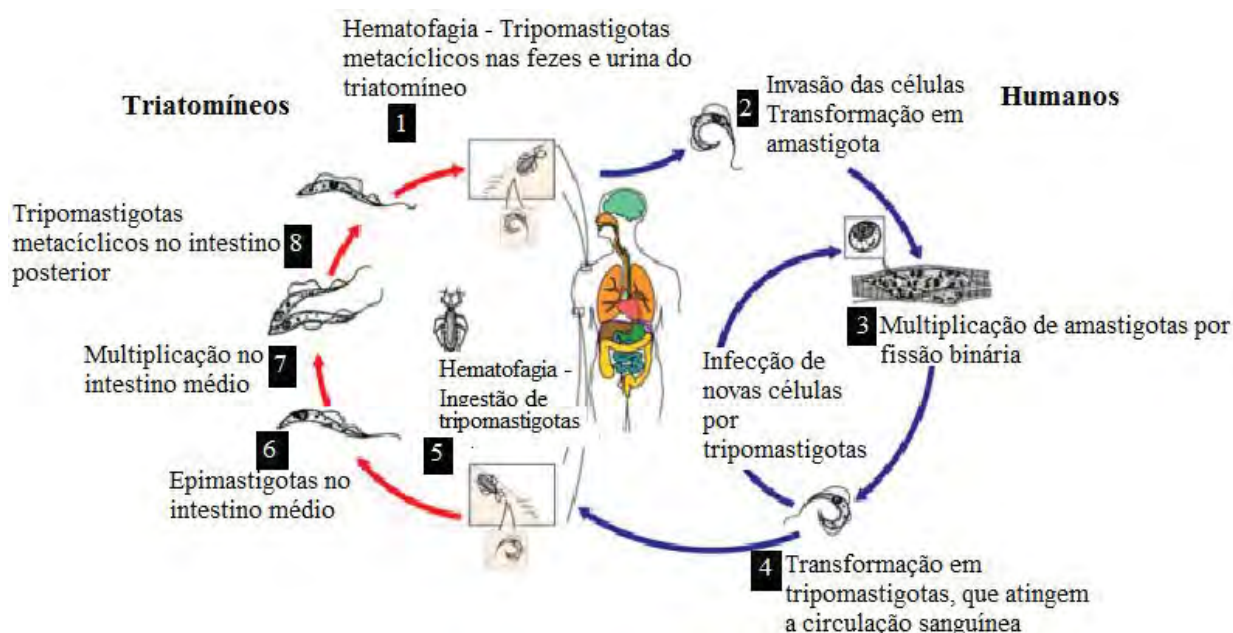
### 2.2 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

O parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, é um protozoário hemoflagelado, da família Trypanosomatidae, que infecta tanto humanos quanto animais domésticos e selvagens (TANOWITZ et al., 1992).

Durante seu ciclo de vida, o parasito apresenta basicamente três formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. Estas formas são caracterizadas quanto à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, flagelo e morfologia (FERRAZ, 2005).

O ciclo biológico de *T. cruzi* envolve o hospedeiro invertebrado, que se infecta por meio da ingestão de sangue contendo as formas tripomastigotas. Essas formas passam por transformações no tubo digestivo dos triatomíneos e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) através da defecação que os insetos realizam logo após a hematofagia (REY, 2002). No hospedeiro vertebrado o parasito se apresenta em duas formas: a tripomastigota, que é a forma encontrada no sangue e infecta várias células (macrófagos, fibroblastos, células neurais e musculares), e a amastigota, que se replica no citosol da célula hospedeira (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

A invasão celular e replicação intracelular são eventos fundamentais para indução da doença e continuação do ciclo de vida do parasito (Figura 1) (VAN OVERTVELT et al., 1999).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *T. cruzi* no homem (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>, modificado por FERRAZ, 2005).

As principais espécies de vetores envolvidas na transmissão da doença de Chagas são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (REY, 2002).

As diferenças morfológicas existentes entre os diferentes estágios evolutivos do parasito, além da variação genética, produzem um grande número de cepas com características individuais. As cepas conferem ao parasito *T. cruzi* tipos de comportamento distintos, como tropismo por diferentes órgãos ou diferença na virulência (CAMARGOS et al., 2000). Estas características podem ser determinadas pela localização geográfica associada às características fisiológicas naturais do protozoário (FERRAZ, 2005).

Após a infecção pelos tripanosomas, observa-se um período de incubação (cerca de sete dias), com posterior invasão de vários tipos celulares como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Porém, *T. cruzi* têm tropismo preferencial por fagócitos mononucleares, células musculares, células adiposas e neurônios (REY, 2002). Após a invasão, a doença de Chagas pode ser classificada em fases aguda e crônica, de acordo com o tempo da infecção e características sorológicas.

A maioria dos pacientes sobrevive na fase aguda inicial, mas alguns desenvolvem, anos depois, as manifestações crônicas da doença caracterizadas por lesões inflamatórias duradouras e desordens do sistema imune (REIS, 1997; TANOWITZ et al., 1992).

A fase aguda é observada por cerca de 30 a 90 dias, sendo uma característica marcante desta fase o grande número de tripanosomas presentes na circulação (parasitemia patente), enquanto a fase crônica é caracterizada pela parasitemia baixa e pelo elevado número de anticorpos circulantes. As manifestações observadas nesta fase são decorrentes do efeito intracelular do parasitismo (FERRAZ, 2005).

Considera-se que no Brasil, a transmissão pelo vetor está sob controle devido ao uso de inseticidas, no entanto, o controle da espécie *Triatoma infestans*, uma das mais importantes na transmissão da doença, tem cedido espaço a outras espécies de triatomíneos capazes de transmiti-la. Além disso, outra importante forma de transmissão é por meio da transfusão sanguínea (SILVEIRA; REZENDE, 1994; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

Buscando-se prevenir a transmissão da doença por transfusão, esforços têm sido concentrados na obtenção de fármacos que eliminem o parasito no sangue, ou seja, uma abordagem quimioprolifática (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007). Esta consiste na esterilização do sangue por substâncias que permitam transfundi-lo com segurança entre seres humanos.

O único agente empregado na quimioprofilaxia de sangue destinado a esse fim é a violeta de genciana. No entanto, existem algumas restrições ao seu uso, pois sendo um corante triarilmetânico, confere ao sangue uma coloração púrpura, podendo manchar pele e mucosas,

causar a microaglutinação e a aglomeração dos eritrócitos, além de apresentar propriedades mutagênicas (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007). É necessário um tempo de exposição de 24 horas, para que haja a esterilização do sangue pela violeta de genciana, tempo considerado longo para pequenos postos onde há carência de sangue estocado, bem como para aquelas situações de emergência, quando a transfusão de sangue requer ação imediata (CHIARI et al., 1996).

Uma forma de transmissão que surge como um problema importante é o transplante de órgãos, devido principalmente a condição de imunossupressão em que se encontra o transplantado, o que pode agravar o quadro da doença (RIARTE et al., 1999).

Recentemente, a infecção oral, através da ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou contaminados com as fezes destes, também tem sido relatada no Brasil e em outros países da América do Sul. Um fato muito preocupante observado nesta forma de infecção é o aumento na letalidade da doença (STEINDEL et al., 2008; DIAS et al., 2008).

### **2.3 Resposta imune na doença de Chagas**

A informação disponível sobre a interação existente entre o sistema imune do hospedeiro e a atividade dos fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas ainda é escassa (FERRAZ, 2005).

A resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasito é a responsável por muitas das manifestações clínicas observadas nesta doença (BRODSKYN; BARRAL-NETTO, 2000). Em cada fase da infecção, existe uma resposta imune específica com um repertório de células, citocinas e outras substâncias, que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo, mas que podem atuar também no desenvolvimento da patologia. Por isso, muitos trabalhos têm sido realizados buscando a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro frente à infecção (FERRAZ, 2005).

O processo inflamatório é iniciado com a infecção, e para a eliminação de patógenos intracelulares, é requerida a participação de células do sistema imune e citocinas características de uma resposta do tipo celular mediada por linfócitos T *helper* 1 (Th1) (JANKOVIC et al., 2001). Uma grande atividade citolítica celular caracteriza esta resposta, que também inclui a ativação dos mecanismos microbicidas das células *Natural Killer* (NK), dos linfócitos T citotóxicos, dos macrófagos e a produção de citocinas incluindo Interleucina

12 (IL-12), Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) (ROMAGNANI, 1992).

A IL-12, secretada por macrófagos e células dendríticas, tem papel fundamental na inflamação e na imunidade adquirida, sendo também requerida para o desenvolvimento das respostas Th1 e para a eliminação de patógenos intracelulares (FRANKLIN, 2005). É uma potente indutora da secreção de IFN- $\gamma$  por células T e NK (WOLF et al., 1991).

Durante a fase aguda da doença, as células NK são capazes de produzir IFN- $\gamma$  em resposta às formas tripomastigotas e independente das células T (CARDILLO et al. 1996).

Camundongos resistentes à infecção por *T. cruzi*, tornam-se suscetíveis ao receberem anticorpo monoclonal anti-células NK, reduzindo drasticamente os níveis de IFN- $\gamma$  e aumentando os de Interleucina 10 (IL-10), produzidos em resposta as formas tripomastigotas (CARDILLO et al. 1996). Embora em menor intensidade, as células NK estão envolvidas na destruição das células infectadas quando há alteração no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) do tipo 1. Porém, os macrófagos é que são as células fundamentais para o controle da replicação do parasito através da fagocitose e síntese de citocinas pró-inflamatórias (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Durante a fase aguda da infecção, uma resposta imune exacerbada é comumente observada no miocárdio de indivíduos infectados, levando a danos colaterais que em casos extremos pode levar a uma resposta inflamatória sistêmica e morte (GUTIERREZ et al., 2009).

O principal desafio no entendimento da imunopatologia durante a cardiomiopatia induzida por *T. cruzi* é compreender porque, apesar da resposta imune robusta verificada no miocárdio durante a fase aguda da infecção, o parasito não é completamente eliminado dos tecidos (SCHIJMAN et al., 2004; GUTIERREZ et al., 2009).

### 2.4 Citocinas envolvidas na doença de Chagas

Além das células efetoras do sistema imune, as citocinas são importantes mediadores que regulam a duração e a intensidade da resposta imune (FERRAZ, 2005). São proteínas solúveis ou glicoproteínas produzidas por leucócitos e outros tipos celulares, que atuam como mediadores químicos (ABBAS et al. 2002).

Estudos com modelos murinos mostraram que a resistência do hospedeiro ao parasito *Trypanosoma cruzi* depende, ao menos parcialmente, das células *natural killer* (NK), células

T e macrófagos, que produzem várias citocinas, entre as quais, podem ser mencionadas a IL-12, IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), envolvidas no controle da doença (TARLETON, 1995; CARDILLO et al., 1996; HUNTER et al., 1997; ABRAHAMSON, 1998; AHUJA et al., 1998; SILVA et al., 1998).

Roggero e cols. (2002) pesquisaram os fatores que influenciam no agravamento da doença de Chagas em linhagens de camundongos e os resultados obtidos mostraram que a disparidade na relação entre as citocinas pró e antiinflamatórias foi a variável associada com o aumento da morbidade. De fato, a resistência à infecção durante a fase aguda está diretamente relacionada à ativação de macrófagos mediada por citocinas (REIS, 1997).

A resistência de camundongos isogênicos à infecção aguda por *T. cruzi* tem mostrado ser dependente de IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO) e causa a morte da forma amastigota intracelular do parasito. Adicionalmente, TNF- $\alpha$  fornece um segundo sinal estimulando a produção de NO e a atividade anti-*T. cruzi* de macrófagos ativado por IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI et al., 1992; PETRAY et al., 1994; ALIBERTI et al., 2001).

Por outro lado, a IL-10 e fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) são associados à suscetibilidade à infecção, inibindo a ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$ . Assim, a neutralização de IL-10 endógena leva a um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , induzida por *T. cruzi*, e consequente morte do parasito. Estes achados sugerem que a IL-10 pode ser um potente inibidor da produção de IFN- $\gamma$  durante a infecção por *T. cruzi* em camundongos e que a resistência à infecção é resultado do equilíbrio entre IFN- $\gamma$  e IL-10 produzido (CARDILLO et al., 1996; ALIBERTI et al., 2001).

### 2.5 Deficiências no tratamento da doença de Chagas

Um ponto importante a ser considerado na doença de Chagas é o fato de que quimioterapia disponível para o tratamento da doença não é totalmente eficaz, uma vez que, os fármacos disponíveis, nifurtimox e benzonidazol, são ativos apenas na fase aguda da doença e apresentam sérios efeitos colaterais. Estes medicamentos causam anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central ou sintomas maníacos, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatites. Devido ao grande número de doses que deve ser administrado por um longo período para que o tratamento obtenha sucesso, estes efeitos são um grande problema (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007). Adicionalmente, a

doença de Chagas representa um importante problema social gerado principalmente pela falta de um medicamento que seja eficaz nas duas fases da doença, ou ainda, em consequência do afastamento das funções profissionais devido a uma série de debilitações e restrições impostas pela doença (UCHÔA et al., 2002). Em razão disto, faz-se importante a pesquisa de novos fármacos capazes de curar o paciente chagásico, independente da fase da doença.

Neste contexto, a busca por novos agentes tripanocidas a partir de fontes naturais, também é uma estratégia válida e importante (CROFT, 1988; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

### **2.6 Produtos naturais para o tratamento da doença de Chagas**

Produtos naturais tripanocidas promissores já estão descritos na literatura e diversos estudos continuam sendo realizados (CHIARI et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1996; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007; BATISTA Jr et al., 2008; LOPES et al., 2008; MOTA et al., 2009; CONTINGUIBA et al., 2009; REGASINI et al., 2009).

Diferenças importantes na resistência ou sensibilidade aos fármacos em uso, em experimentação em laboratório ou em estudos clínicos, foram relatadas dentre as diferentes cepas do parasito. Esta situação torna mais difícil encontrar novos fármacos anti *T. cruzi* (MORELO et al., 1994). Assim, a carência de medicamentos mais eficazes para a cura da infecção nas suas fases aguda e crônica permanece (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

Segundo Saúde-Guimarães e Faria (2007), é evidente a necessidade de um programa interdisciplinar de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes na quimioprofilaxia e, principalmente, na quimioterapia da doença de Chagas, inclusive substâncias, que ao serem adicionadas ao sangue eliminem os tripomastigotas, e possam substituir a violeta genciana, que apesar de ser eficaz apresenta efeitos colaterais que dificultam seu uso.

Nesse sentido, as plantas têm se mostrado uma rica fonte de substâncias com atividade contra as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, e se apresentam como uma das direções promissoras na busca de substâncias bioativas eficazes na prevenção e tratamento da doença de Chagas.

### 2.7 Importância das plantas na obtenção de matérias-primas farmacêuticas

O Reino vegetal é o maior reservatório de moléculas orgânicas conhecido, além de ser um poderoso laboratório de síntese. Diversas moléculas com estrutura complexa ainda dependem de síntese biológica, pois a síntese em laboratório não pode ser feita ou é economicamente inviável; por isso, plantas medicinais são utilizadas como matéria-prima para a produção de medicamentos (ALVES; SILVA, 2002).

O Brasil, detentor de enorme biodiversidade faz uso extensivo de plantas medicinais como terapia alternativa e/ou como suporte às terapias convencionais. Entretanto, a premissa de que medicamentos preparados de plantas são seguros e isentos de efeitos adversos é falsa, pois elas contêm centenas de constituintes e alguns deles são muito tóxicos como, por exemplo, as substâncias citotóxicas derivadas de plantas com atividade antitumoral. Ainda assim, estudos clínicos apontam que os efeitos adversos de agentes fitoterápicos são menos freqüentes quando comparados com os de fármacos sintéticos (CALIXTO, 2000).

O Brasil apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos de origem vegetal. Mas, são gastos cerca de dois a três bilhões de dólares por ano na importação de matérias-primas utilizadas no preparo de medicamentos, sendo que 84% dos fármacos consumidos no Brasil são importados e que 78 a 80% da produção é feita por indústrias multinacionais, justificando a busca por alternativas que superem a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira (VARANDA, 2006; NUNES, 2008).

As plantas apresentam um importante papel na descoberta de novas drogas por serem uma fonte de grande variedade de moléculas, que podem ser utilizadas pela comunidade científica na obtenção de substâncias sintéticas ou semi-sintéticas visando o desenvolvimento de fármacos e o tratamento de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2007).

### 2.8 Gênero *Alchornea*

Conegero e cols. (2003) observaram grande ocorrência de espécies do gênero *Alchornea*, nos diversos biomas naturais, sendo encontrada também no Brasil. Este gênero tem sido utilizado como agente antidiarréico, antiinflamatório, anti-reumático, no tratamento de hanseníase e de outras doenças cutâneas.

O estudo químico da espécie *A. glandulosa*, revelou a presença de compostos fenólicos, como o ácido gálico (BULLA et al., 2004).



Nesse contexto, o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossínteses e Ecofisiologia de Produtos Naturais), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara, que vem desenvolvendo estudos de bioprospecção, obteve ésteres semi-sintéticos de ácido gálico extraído em quantidades apreciáveis de *A. glandulosa*, os quais apresentaram a atividade tripanocida avaliada neste trabalho.

### 2.9 O ácido gálico e seus ésteres

Polifenóis de plantas são conhecidos por apresentarem atividade biológica como antimutagenicidade, anticarcinogenicidade e atividade antioxidante (YEN et al., 2002).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um composto polihidroxifenólico, que pode ser encontrado em vários produtos naturais como plantas, frutas, chás e vinhos. Ele é conhecido também por ser um potente antioxidante natural e farmacologicamente ativo como agente antialérgico, antimutagênico, antiinflamatório e anticarcinogênico (GALI et al., 1991; GALI et al., 1992; MADLENER et al., 2007; GIFTSON et al., 2009), além de apresentar maior citotoxicidade sobre células tumorais em comparação com células não tumorais (INOUE et al., 1994).

O ácido gálico e seus n-alquil ésteres, especialmente o galato de propila, octila e dodecila, são amplamente utilizados como aditivos alimentares para sequestrar espécies reativas de oxigênio, incluindo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila (VAN DER MEEREN, 1987).

Eles também são utilizados em alimentos processados, cosméticos e materiais de embalagem de alimentos para prevenir o ranço induzido pela peroxidação lipídica e deterioração (YEN et al., 2002). Possuem potencial antibacteriano, agindo também contra esporos (KUBO et al., 2003), ação sinérgica com antibiótico  $\beta$ -lactâmico, em caso de bactéria resistente (SHIBATA et al., 2005), ação antifúngica (FUJITA; KUBO, 2002), antitumoral (FREY et al., 2007), e ação inibitória sobre enzimas como hialuronidase, colagenase (BARLA et al., 2009) e esqualeno epoxidase (ABE et al., 2000<sup>1</sup>).

Durante os estudos sobre as suas relações estrutura-atividade, uma série de n-alquil ésteres de ácido gálico exibiram atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* (KUBO, 1999). O ácido gálico não apresentou atividade antifúngica, enquanto que os n-alquil ésteres de ácido gálico apresentaram maior atividade antifúngica quanto maior fosse o comprimento da cadeia de carbonos dos grupos n-alquila (FUJITA; KUBO, 2002). A máxima

atividade fungicida contra *S. cerevisiae* foi observada com o galato de nonila. Curiosamente, o galato de decila não mostrou qualquer atividade antifúngica. Isto é conhecido como um fenômeno de corte (“cutoff phenomenon”), que tem sido observado na atividade antifúngica de n-alcanos e ácidos graxos livres contra *S. cerevisiae* (KUBO et al. 1995; FUJITA; KUBO, 2002).

### **2.10 Avaliação da toxicidade celular**

Linhagens de células hepáticas são amplamente utilizadas em pesquisas que envolvem metabolismo de compostos químicos e estudos de genotoxicidade, sendo as células HepG2 as mais versáteis para estes tipos de estudo (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

As técnicas utilizadas na determinação da citotoxicidade de um agente químico normalmente avaliam viabilidade ou condições funcionais celulares. Testes quantitativos baseados em mudanças colorimétricas são versáteis e foram idealizados utilizando leitores de ELISA (espectrofotômetro multicanais). Estes testes podem medir de uma só vez um grande número de substâncias com alto grau de precisão. São testes que se baseiam na utilização de um substrato incolor ou não, que é modificado para produto com característica diferente da original, pelas células vivas, mas não por células mortas ou através de uma modificação em constituintes do meio de cultivo (BARILE et al., 1994).

Uma técnica muito eficiente e amplamente utilizada em ensaios de toxicidade e viabilidade celular é a técnica colorimétrica que utiliza MTT, desenvolvida por Mosmann em 1983, que foi utilizada neste trabalho conforme descrito mais adiante.

### **2.11 Avaliação de apoptose celular**

Na apoptose ocorrem alterações morfológicas nas células, tais como a condensação e fragmentação nuclear e da cromatina, que podem ser avaliadas por microscopia fluorescente utilizando corantes supravitais, tais como acridina orange e brometo de etídio, podendo identificar células viáveis e não-viáveis (BLANCO et al., 2005).

A diminuição do volume celular também pode ser considerada como parte do fenótipo apoptótico quando presente em conjunto com as alterações bioquímicas e morfológicas (BLANCO et al., 2005). Outra característica apoptótica dos vertebrados superiores é a redução do potencial transmembrana mitocondrial (KROEMER et al., 1997).

Em organismos unicelulares, a morte celular programada tem atraído considerável atenção; vários estudos têm mostrado que diferentes substâncias induzem os parasitos a morrer via apoptose mitocôndria-dependente (DEBRABANT et al., 2003; SOUZA et al., 2009).

Nos últimos anos, os efeitos de vários fármacos que interferem diretamente com a fisiologia e ultraestrutura mitocondrial em protozoários como *Trypanosoma* têm sido descritos (RODRIGUES; SOUZA, 2008; SEN; MAJUMDER, 2008).

O DNA mitocondrial de tripanosomatídeos é encontrado em uma estrutura conhecida como cinetoplasto (LUKES et al., 2002; SOUZA; CAVALCANTI, 2008). Estudos citoquímicos mostraram que o cinetoplasto é constituído de DNA, fornecendo algumas das primeiras evidências da presença de DNA extranuclear (VICKERMAN; COOMBS, 1999, SOUZA et al., 2009). Em seguida, estudos de microscopia eletrônica mostraram claramente que o cinetoplasto representa uma porção da mitocôndria única de cinetoplastídeos (MEYER et al., 1958; MEYER, 1968).

A pentamidina é uma substância dicatiônica que interfere no metabolismo mitocondrial e que tem sido utilizada nos últimos 50 anos para o tratamento da tripanossomíase africana, bem como em casos de leishmaniose resistente a antimônio (SANDS et al., 1985). Vercesi e Docampo (1992) mostraram que a pentamidina é capaz de causar um colapso no potencial de membrana mitocondrial e levar a um desequilíbrio no conteúdo intracelular de  $Ca^{2+}$ .

A pentamidina induz a morte celular por apoptose em *Leishmania donovani*, por consequência da aumentada citotoxicidade devido a seu acúmulo na matriz mitocondrial (MEHTA; SHAHA, 2004; MUKHERJEE et al., 2006). Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão de células tratadas com pentamidina revelou a condensação e rompimento do DNA do cinetoplasto e do colapso da membrana mitocondrial (HENTZER; KOBAYASI, 1977; CROFT; BRAZIL, 1982).

### 2.12 Aplicação da citometria de fluxo

O aprimoramento da biologia molecular e celular tem proporcionado a utilização de técnicas diagnósticas que produzem um resultado confiável em poucos minutos ou horas, sendo que dentre os novos métodos decorrentes deste aprimoramento, a citometria de fluxo deve ser citada.

O advento de técnicas fluorescentes, em especial a citometria de fluxo, propiciou o surgimento de novas possibilidades em relação à detecção de bioindicadores intracelulares. Esta técnica pode permitir a mensuração de vários parâmetros celulares, entre eles, tamanho, granulosidade e complexidade (CAVALCANTI et al., 2008).

Rocha e cols. (2002) sugeriram a aplicabilidade da citometria de fluxo na identificação dos casos de infecção ativa de *Leishmania braziliensis*, que não tem sido possível através das reações sorológicas convencionais.

Outra aplicação é a detecção de imunoglobulinas específicas presentes em amostras, as quais podem ser detectadas graças à utilização de microesferas ligadas aos antígenos dos microrganismos. Os anticorpos da amostra são detectados após a adição de um segundo anticorpo conjugado a um corante fluorescente (RENESTO et al., 2003).

Segundo Martins-Filho et al. (1995), o soro sanguíneo de pacientes cronicamente infectados com *T. cruzi* apresenta anticorpos que se ligam aos epítomos de tripomastigotas vivos. Estes autores conseguiram, pela primeira vez, aplicar a técnica de citometria de fluxo para investigar esta ligação. Eles sugerem que a citometria de fluxo pode ser um método poderoso para relacionar anticorpos ligados à membrana com a eficácia de tratamentos para a doença de Chagas.

A citometria de fluxo é uma metodologia que pode ser aplicada para vários estudos de atividade celular, inclusive para a detecção da apoptose (MACHADO JUNIOR et al., 2006).

Dutta e cols. (2007), utilizando a citometria de fluxo, testaram o efeito de uma substância de origem vegetal sobre *Leishmania donovani*, verificando seu efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial. Para isto, utilizaram um corante permeável à célula, que em mitocôndrias de células saudáveis, com elevado potencial de membrana, forma agregados que emitem fluorescência vermelha, sendo que, nas células em processo de apoptose, o potencial de membrana mitocondrial diminui, favorecendo a permanência do corante em monômeros, que irão emitir fluorescência verde.

Alterações no potencial transmembrana podem ser avaliadas por sondas fluorescentes, como sondas 5, 5', 6, 6' - tetrachloro - 1, 1', 3, 3' - tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) (COSSARIZZA et al., 1993; KULKARNI et al., 1998).

O JC-1 é um fluorocromo lipofílico usado para avaliar o estado do potencial de membrana (BD BIOSCIENCES). A emissão do espectro de fluorescência do JC-1 é dependente de sua concentração, que por sua vez é determinada pelo estado do potencial de membrana. JC-1 pode existir em dois estados, na forma de agregados ou monômeros, cada

qual com uma diferente emissão de espectro. JC-1 forma monômeros em baixas concentrações do corante, e forma agregados em altas concentrações. Quando células vivas são incubadas com JC-1, este penetra na membrana plasmática das células como monômeros. A entrada do JC-1 na mitocôndria é controlada pelo potencial de membrana. O potencial de membrana da mitocôndria saudável é polarizado e JC-1 rapidamente ocupa essa mitocôndria. Isso aumenta o gradiente de concentração de JC-1 levando à formação de agregados JC-1 dentro da mitocôndria. Agregados JC-1 apresentam um espectro vermelho, resultando em maiores níveis de emissão de fluorescência vermelha.

JC-1 não se acumula na mitocôndria com potencial de membrana despolarizado e permanece no citoplasma como monômero. Estes monômeros não têm o espectro vermelho e, conseqüentemente, tem baixa fluorescência. A formação dos agregados de JC-1 é reversível. Portanto, na mitocôndria sofrendo uma transição do potencial de membrana polarizado para despolarizado (devido a apoptose ou outros eventos fisiológicos), o JC-1 sai da mitocôndria para o citoplasma como monômero resultando em diminuição da fluorescência vermelha (BD™ MITOSCREEN, BD BIOSCIENCES).



Justificativa

O Brasil apresenta a flora mais diversificada do mundo, tendo esta temática alcançado um ponto crítico, pois, por um lado, a ciência da biodiversidade aumenta em quantidade e em qualidade, enquanto que por outro, a destruição de habitats nos grandes biomas brasileiros se mantém em taxas alarmantes (SUFFREDINI et al., 2006; SCARANO, 2007).

Historicamente, as plantas e os microrganismos têm provido a indústria farmacêutica, substâncias importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Ainda, as plantas medicinais se tornaram uma importante fonte de quimioterápicos (MANSOUR et al., 2007). Dessa forma, compostos isolados e derivados de plantas vêm sendo estudados pelo nosso grupo, em colaboração com outros, a fim de avaliar sua capacidade tripanocida.

Tendo em vista a descrição anterior sobre a doença de Chagas, principalmente no que diz respeito aos fármacos disponíveis para o tratamento da doença e os efeitos colaterais sofridos pelos pacientes, a prospecção por substâncias tripanocidas, a partir de plantas, é uma estratégia válida e importante, que se torna mais promissora em um país como o Brasil com enorme biodiversidade.

Nossa equipe vem colaborando de maneira profícua com o grupo da Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva do NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossínteses e Ecofisiologia de Produtos Naturais) do Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara, avaliando substâncias puras e semi-sintéticas com atividade tripanocida. Essa colaboração possibilitou a realização deste trabalho, que além da prospecção, investigou possíveis mecanismos de ação das substâncias estudadas.



**Objetivos**



## 4.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos no tratamento da doença de Chagas.

Em continuidade com outros projetos de pesquisa (processos FAPESP: 2008/06021-1; 2007/02076-3; 2004/07932-7), este projeto teve por objetivo verificar o potencial tripanocida do ácido gálico isolado da espécie *Alchornea glandulosa*, bem como seus ésteres semi-sintéticos. Foram avaliados também os efeitos destas substâncias em células de mamíferos (murinas e HepG2), com intuito de obter mais informações relevantes sobre a possibilidade de seu emprego no desenvolvimento de agentes terapêuticos para a doença de Chagas.

## 4.2 Objetivos específicos

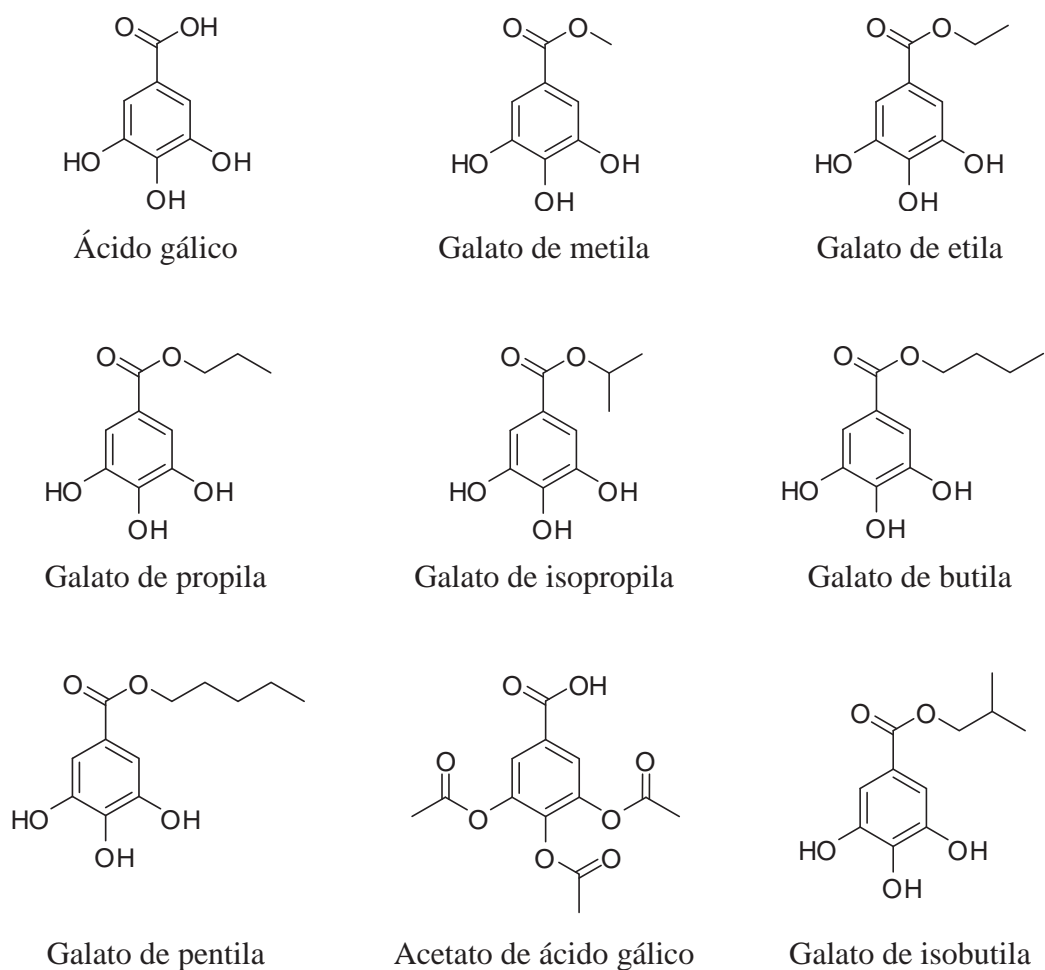
- 1) Avaliação da atividade tripanocida do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos nas formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- 2) Avaliação da citotoxicidade de ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos, na presença de células de mamíferos;
- 3) Análise por citometria de fluxo do efeito do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos no potencial da atividade mitocondrial dos parasitos;
- 4) Quantificação em macrófagos murinos das principais citocinas envolvidas na resposta imune.

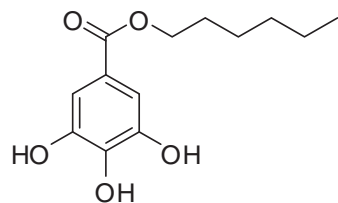


**Material  
e Métodos**

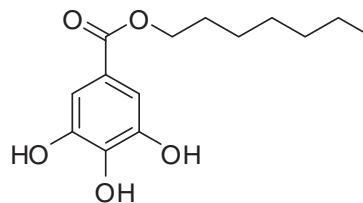
**5.1 Moléculas.** O ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos foram obtidos pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossínteses e Ecofisiologia de Produtos Naturais), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara e cedidos para as avaliações de atividade biológica.

As substâncias utilizadas nos ensaios estão apresentadas na Figura 2.

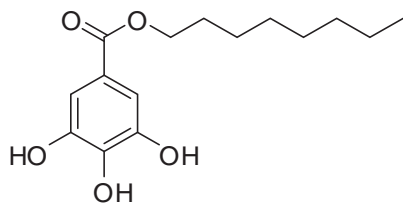




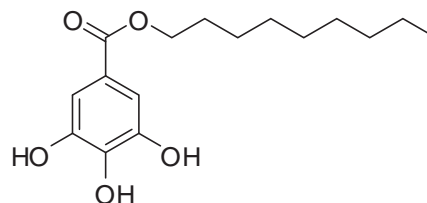
Galato de hexila



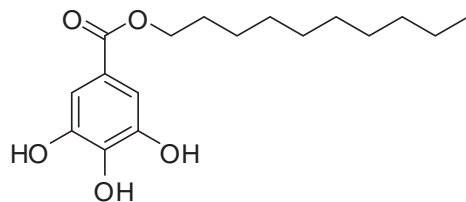
Galato de heptila



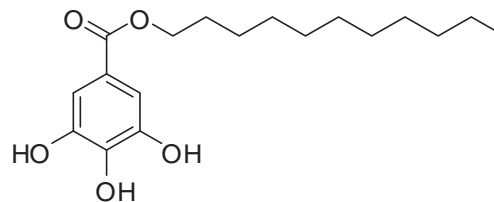
Galato de octila



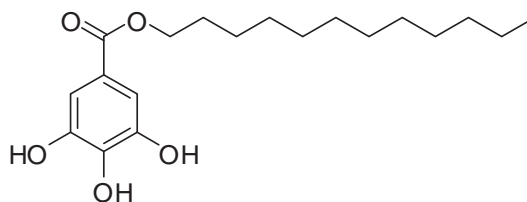
Galato de nonila



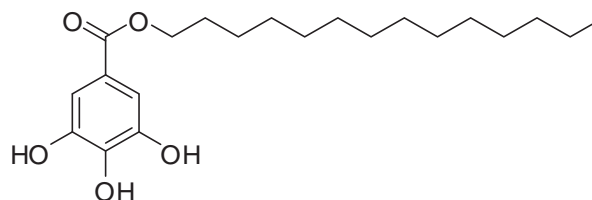
Galato de decila



Galato de undecila



Galato de dodecila



Galato de tetradecila

**Figura 2.** Estrutura do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos utilizados nos ensaios biológicos.

**5.2 Parasitos.** Para os experimentos com parasitos foram utilizadas formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, crescidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 28 °C.

A forma epimastigota de *T. cruzi* foi escolhida para se realizar este experimento por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura.

Os parasitos foram cultivados em meio LIT (Apêndice 1) - Liver Infusion Tryptose (FERNANDES; CASTELLANI, 1966) a 28 °C, com repiques a cada 15 dias para a manutenção da cultura no laboratório. A cepa Y, descrita por Silva; Nussenzweig (1953) é considerada uma cepa padrão do tipo I.

**5.3 Camundongos.** Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 (WRIGHTSMAN et al., 1982; HOFT et al., 1993), com 6 a 10 semanas de vida, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB-Unicamp). Estas duas linhagens foram escolhidas, pois são linhagens isogênicas, que apresentam sequências de ácidos nucléicos idênticas em qualquer parte de seus cromossomos, ou seja, toda linhagem é geneticamente idêntica (singênica) (ABBAS et al., 2002). Outro motivo desta escolha foi a diferença quanto à suscetibilidade ao *T. cruzi* apresentada por estas linhagens; camundongos BALB/c são relativamente suscetíveis a infecção pelo parasito, desenvolvendo uma alta parasitemia que pode levar à mortalidade em larga escala após a infecção. Enquanto que camundongos como o C57BL/6 são relativamente resistentes ao *T. cruzi* (WRIGHTSMAN et al., 1982; HOFT et al., 1993).

A utilização dos animais para a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP com o parecer nº 25/2009.

### **5.4 Linhagem celular de hepatoma humano - HepG2**

As células HepG2, uma linhagem celular de hepatoma humano, foram escolhidas por serem comumente utilizadas em testes de toxicidade *in vitro* pela sua origem humana, facilidade de uso (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004) e por serem células metabolizadoras que mantêm as características de hepatócitos (JAVITT, 1990).

A linhagem utilizada nos ensaios de toxicidade celular foi doada pela Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro (Universidade de São Paulo - USP) à Profa. Dr. Vera Lúcia Borges Isaac, do laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

### 5.5 Avaliação da atividade tripanocida (IC<sub>50</sub>) contra formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo método do MTT

Através do ensaio colorimétrico do MTT (MUELAS-SERRANO et al., 2000, adaptado por COTINGUIBA et al., 2009) foi quantificada a atividade tripanocida do ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Este ensaio utiliza o sal de tetrazolium para avaliar a sobrevivência e proliferação celular. O ensaio detecta somente as células vivas e o sinal gerado depende do grau de ativação das células. Este método pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação ou ativação de células e os resultados podem ser lidos em um espectrofotômetro (leitor de ELISA) com um alto grau de precisão. É um método vantajoso devido à rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, em fluxo laminar.

Após diluições em meio LIT, 3 µL de cada substância (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 e 0,1 µg/mL, respectivamente) foram adicionados a 97 µL de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* (fase log). A placa foi incubada em câmara úmida a 28°C (BOD) por 72 horas.

A seguir, adicionou-se 10 µL de solução MTT/PMS (Apêndice 2) em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo de luz por 75 minutos a 28°C. Neste momento, ocorre a redução do sal tetrazolium - MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio] em um produto colorido, o *formazan* (DUTTA et al., 2005).

Foram adicionados 100 µL da solução 10% SDS-0,01 N HCl, para dissolver os cristais de *formazan*, sendo posteriormente incubado à temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. Através das leituras de absorbância calculou-se a viabilidade celular para cada concentração testada e a determinação do IC<sub>50</sub> foi obtida através do gráfico gerado pelo software Origin 7.0.

As concentrações do IC<sub>50</sub> foram obtidas em µg/mL e, em seguida, foram transformadas em µM.

### 5.6 Determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) em macrófagos peritoneais de camundongos

Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, foram inoculados intraperitonealmente com 3 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3%. Três dias após, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Após a morte e exposição do peritônio, a pele do animal foi aberta, sendo injetados 5 mL de tampão fosfato estéril (PBS) (Apêndice 3), prosseguindo com leve massagem manual.

As células foram coletadas do peritônio e transferidas para tubo estéril, mantidos em banho de gelo. Para o preparo da suspensão celular, centrifugou-se três vezes a 200x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI – 1640 completo (Apêndice 4) e o número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer utilizando corante vital líquido Lázarus, sendo ajustado à concentração de 5x10<sup>6</sup> células/mL em meio RPMI – 1640 Completo para os testes de citotoxicidade.

Dessa suspensão, foram adicionados 100 µL em cada poço da placa (96 poços) de poliestireno estéril. Em seguida, foi adicionado, em triplicata, 100 µL de cada uma das substâncias diluída em meio de cultura RPMI-1640 completo (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL, respectivamente). Como controle foi utilizado o mesmo volume de RPMI-1640 Completo.

A incubação da placa foi feita durante 24 horas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após esse período, 100 µL de uma solução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio] diluído em meio RPMI-1640 (Apêndice 5) foi adicionada em cada poço, seguindo incubação por 3 horas (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após a incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 µL de isopropanol para solubilizar os cristais de *formazan*.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 595 nm (Leitor de ELISA – BioRad).

### 5.7 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo pela técnica de exclusão do corante azul de tripan

Após obtenção dos macrófagos murinos, estes foram tratados com diluições das substâncias de interesse até a concentração máxima de 100 µg/mL por 24 horas. Após este período o sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 100 µL de solução salina

suplementada com 5% de soro fetal bovino às células aderidas à placa. Em seguida, as células foram coradas com 100 µL de solução de azul de trypan a 0,4% (Apêndice 6) seguindo-se com a contagem dos macrófagos viáveis e não viáveis em câmara de Neubauer.

### **5.8 Determinação da citotoxicidade das substâncias em células de hepatoma humano (HepG2)**

As células HepG2 foram cultivadas em garrafas de cultura de células, com meio Meio Essencial Mínimo - MEM (Apêndice 7), suplementado com 10% de Soro fetal bovino – SFB (Cultilab), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram utilizadas após pelo menos 3 passagens em meio de cultura.

As células foram tripsinizadas (Apêndice 8) e após 5 minutos foram transferidas para tubo de centrífuga de 15 mL, sendo adicionado meio MEM contendo SFB para neutralização da tripsina. Após este procedimento, as células foram centrifugadas a 400x g por 3 minutos, com posterior remoção do sobrenadante e contagem em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 1x10<sup>6</sup> céls/mL. A suspensão foi plaqueada em placa de 96 poços de poliestireno estéril, com volume de 100 µL por poço, com uma concentração final de 1x10<sup>5</sup> células/poço. A suspensão permaneceu na placa durante 24 horas para adesão das células, sendo após este período, tratada com concentrações diferentes das substâncias testadas (galatos de heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila), como controle negativo utilizou-se o mesmo volume de meio de cultura MEM – suplementado e, como controle positivo, utilizou-se DMSO a 10% em meio de cultura MEM. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi retirado e a placa delicadamente lavada com tampão fosfato estéril (PBS) (Apêndice 3), para eliminar riscos de interação entre o meio ou resíduos das substâncias com o MTT. Após a lavagem acrescentou-se 100 µL de solução de MTT, diluído em meio MEM (Apêndice 9), sem soro fetal bovino, seguindo incubação durante 3 horas, para a reação do MTT. Após este período o sobrenadante foi novamente retirado e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados para solubilização dos cristais de *formazan* e posterior leitura da absorbância em leitor de placas a 595 nm (BioRad). Todos os testes foram realizados em triplicata.



### 5.9 Cálculo do índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>)

Índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), que corresponde à concentração do agente que reduz em 50% a viabilidade celular dos parasitos, foi determinado graficamente para todas as substâncias avaliadas a partir de uma curva dose-resposta (concentração *versus* viabilidade celular). Esta curva foi obtida através da análise da regressão linear dos resultados no ensaio realizado com diversas concentrações das substâncias avaliadas, com limite de confiança de 95%. IC<sub>50</sub> foi definido através da equação da reta gerada, utilizando o software Origin 7.0.

### 5.10 Determinação do Índice de Segurança das substâncias (*Safety Index – SI*)

Índice de Segurança (SI) foi calculado através do quociente entre os resultados de IC<sub>50</sub> das substâncias com as células HepG2 e os parasitos (LARGERON et al., 1999), ou seja,  $SI = IC_{50} \text{ HepG2} / IC_{50} T. \text{ cruzi}$ .

### 5.11 Perfil de produção das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e TGF- $\beta$ por macrófagos murinos incubados com os ésteres mais ativos em *T. cruzi*

Os macrófagos murinos, obtidos conforme descrito anteriormente foram incubados na presença das substâncias de interesse, na concentração de 30  $\mu$ M. Após 24 horas, o sobrenadante foi aspirado e utilizado para a quantificação das citocinas.

A quantificação foi realizada através do método de ELISA, seguindo-se o protocolo do fabricante (kit ELISA Read Set Go).

### 5.12 Determinação do potencial apoptótico dos ésteres de ácido gálico em formas epimastigotas de *T. cruzi* por citometria de fluxo

Para avaliação do potencial apoptótico das substâncias sobre o parasito *T. cruzi*, culturas da forma epimastigota com  $1 \times 10^5$  formas/mL foram obtidas, e em seguida, incubadas durante 72h na presença das substâncias que apresentaram maior potencial tripanocida, ou seja, galatos de heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila. As concentrações utilizadas foram as mesmas do IC<sub>50</sub>, obtidas através da avaliação de citotoxicidade sobre os parasitos. Como controle negativo utilizou-se meio de cultura e, como

controle positivo, a pentamidina na concentração de 10 µg/mL (29,3 µM) durante 72 horas de incubação. Esta concentração foi utilizada por ter sido determinado anteriormente como o valor de IC<sub>50</sub> da pentamidina para epimastigotas de *T. cruzi* (GRACE et al., 2004).

Após o período de incubação retirou-se 1 mL de cada cultura passado para tubos de 15 mL para centrifugação a 400x g por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 0,5 mL de solução de corante JC-1 (BD<sup>TM</sup> MITOSCREEN KIT), seguindo de incubação por 15 minutos. Após este período acrescentou-se 2 mL de tampão (JC-1 Wash Buffer), centrifugou-se, sendo o sobrenadante retirado e o pellet novamente ressuspenso em 1 mL de tampão para nova centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspenso em 0,5 mL de tampão para posterior análise por citometria de fluxo (FACSCanto I - BD Biosciences).



Resultados  
e Discussão

**6.1 Avaliação da atividade tripanocida (IC<sub>50</sub>) contra formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo método do MTT**

O ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos (galatos de metila, etila, propila, butila, pentila, hexila, heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila, tetradecila, isopropila, isobutila, e acetato de ácido gálico) foram avaliados quanto a seu potencial tripanocida contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT estão apresentados na Tabela 1.

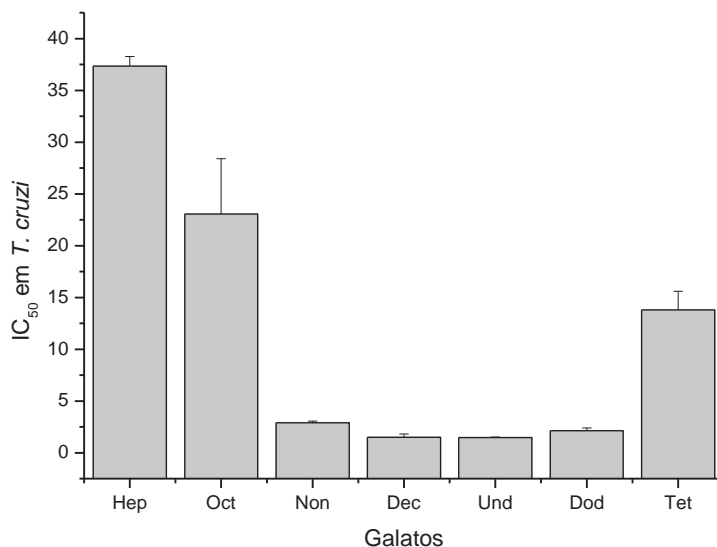
**Tabela 1.** Atividade tripanocida, expressa em IC<sub>50</sub>, do benzonidazol, ácido gálico e ésteres semi-sintéticos de ácido gálico contra formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Substâncias	Fórmula molecular	IC <sub>50</sub> (μM)
Benzonidazol	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	34,0
Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de metila	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de etila	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de propila	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de isopropila	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de butila	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de pentila	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Acetato de ácido gálico	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	>100,0
Galato de isobutila	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de hexila	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	>100,0
Galato de heptila	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	37,3
Galato de octila	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	23,0
Galato de nonila	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	2,9
Galato de decila	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	1,5
Galato de undecila	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	1,4
Galato de dodecila	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	2,1
Galato de tetradecila	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	17,6

Pela avaliação dos valores de  $IC_{50}$  expostos na Tabela 1, o ácido gálico, os galatos de metila, etila, propila, butila, pentila, hexila, isopropila, isobutila e o acetato de ácido gálico apresentaram  $IC_{50}$  maior do que  $100 \mu\text{M}$ , concentração esta muito superior ao do fármaco padrão, benzonidazol.

Entretanto, foi possível verificar que a esterificação da molécula de ácido gálico deu origem a moléculas que apresentam interessante atividade tripanocida, tornando-se mais potente de acordo com o tamanho da cadeia carbônica. Por este motivo, os galatos de heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila, foram os que apresentaram efeito tripanocida mais intenso quando comparado ao benzonidazol, com exceção do galato de heptila, cujo  $IC_{50}$  ficou ligeiramente acima ( $37,34 \mu\text{M}$ ). Esses resultados confirmam a relação entre a atividade biológica dos galatos e o tamanho da cadeia carbônica, conforme observado em trabalhos anteriores (KUBO et al., 1995; FUJITA; KUBO, 2002).

A representação gráfica da atividade tripanocida das substâncias mais ativas está apresentada na Figura 3.



**Figura 3.** Representação gráfica da atividade tripanocida dos ésteres de ácido gálico mais ativos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*: Galatos de heptila (Hep), octila, (Oct), nonila (Non), decila (Dec), undecila (Und), dodecila (Dod) e tetradecila (Tet).

Por outro lado, observou-se, também, que o aumento da cadeia carbônica além de determinado tamanho levou a uma redução no potencial tripanocida das moléculas, como observado com os galatos de dodecila e tetradecila. Esses dados também estão de acordo com

os de Kubo (1995) e Fujita e Kubo (2002), que observaram o chamado “fenômeno de corte”, avaliando a atividade antifúngica de ésteres de ácido gálico e verificando que alguns ésteres possuíam alta atividade, mas que cadeias laterais com um número muito alto de carbonos resultavam em substâncias sem atividade.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os galatos de decila e undecila foram os que apresentaram maior toxicidade ao parasito.

IC<sub>50</sub> das substâncias mais ativas contra o parasito e o desvio padrão entre as médias das triplicatas estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** IC<sub>50</sub> (média) e desvio padrão das substâncias mais ativas.

<b>Substância</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>Desv. Padrão</b>
Galato de Heptila	37,3 <sup>a</sup>	±0,9
Galato de Octila	23,0 <sup>b</sup>	±5,3
Galato de Nonila	2,9 <sup>c</sup>	±0,1
Galato de Decila	1,5 <sup>d,e</sup>	±0,3
Galato de Undecila	1,4 <sup>d</sup>	0,0
Galato de Dodecila	2,1 <sup>e</sup>	±0,2
Galato de Tetradecila	13,8 <sup>f</sup>	±1,8

a,b,c,d,e,f letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes.

A partir dos dados obtidos na avaliação da atividade tripanocida, as substâncias mais ativas, ou seja, aquelas que apresentaram as melhores atividades foram escolhidas para o ensaio de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos, visando também a avaliação do IC<sub>50</sub>.

## 6.2 Determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) em macrófagos peritoneais de camundongos

O ensaio de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos foi realizado através do método colorimétrico do MTT, na presença das substâncias que apresentaram melhor atividade tripanocida, ou seja, galatos de heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila.

Este ensaio demonstrou viabilidade de 100% dos macrófagos murinos até a

concentração de 100  $\mu\text{M}$  para todas as substâncias testadas. Para a obtenção do  $\text{IC}_{50}$  foi então necessário o aumento da concentração das substâncias.

Com o aumento das concentrações, observou-se que algumas leituras de absorbância correspondiam a uma viabilidade superior à viabilidade observada no controle (macrófagos não tratados), ou seja, superior a 100%, um resultado que não era esperado. Por essa razão, realizou-se um teste na ausência de macrófagos, o que revelou a existência de um resultado falso-positivo, devido à interação entre os reagentes utilizados no ensaio.

Bruggisser et al. (2002) relataram a ocorrência de resultados falso-positivos com a utilização do MTT, devido à ação de substâncias antioxidantes presentes no meio de cultura ou da própria substância testada ser capaz de provocar a redução do MTT. Por este motivo, esses resultados foram desconsiderados e, então, utilizada a técnica de exclusão do corante azul de tripan para essa avaliação.

### **6.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo pela técnica de exclusão do corante azul de tripan**

Esta técnica possibilita a contagem de células vivas e mortas, uma vez que o corante é capaz de penetrar em células mortas, corando-as de azul, o que não ocorre nas células vivas, que permanecem incolores, sendo assim possível distinguir os macrófagos viáveis dos não-viáveis.

A obtenção dos macrófagos e a incubação seguiram os mesmos procedimentos utilizados no teste do MTT, descrito em material e métodos.

Entretanto, também para este teste não foi possível o estabelecimento de uma curva dose-resposta, devido a contagens muito divergentes nas triplicatas, ou seja, não houve reprodutibilidade. Uma possível explicação para esse resultado poderia ser a reação química entre as substâncias e o azul de tripan.

Assim, ambos os métodos não se mostraram eficientes para calcular  $\text{IC}_{50}$  das substâncias para os macrófagos peritoneais murinos. No entanto, observou-se que para todas as substâncias testadas a concentração de 30  $\mu\text{M}$  não promoveu 50% de morte celular em nenhum dos experimentos, demonstrando a baixa citotoxicidade das mesmas em relação às concentrações encontradas para o parasito.

#### 6.4 Determinação da citotoxicidade das substâncias em células de hepatoma humano (HepG2)

O ensaio de citotoxicidade em células de hepatoma humano (HepG2) foi possível de ser realizado através do método colorimétrico do MTT, na presença das substâncias que apresentaram maior atividade tripanocida, ou seja, as substâncias galato de heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tetradecila. Possivelmente, o meio MEM seja o mais adequado para essas avaliações.

Os valores de IC<sub>50</sub> das substâncias para as células HepG2 estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Toxicidade do benzonidazol e dos ésteres de ácido gálico, representado em IC<sub>50</sub> (μM) sobre células metabolizadoras humanas (HepG2).

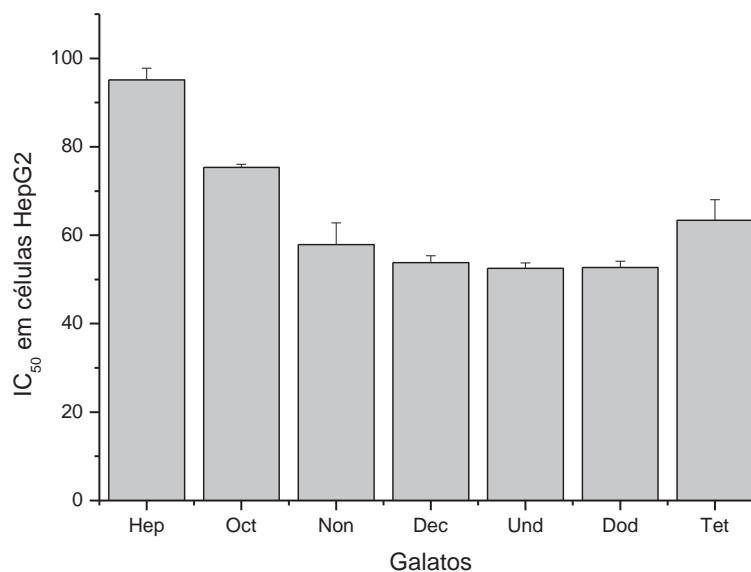
Substância	IC <sub>50</sub> (Média)	Desv. Padrão
Benzonidazol	>100	-
Galato de Heptila	95,1	±2,6
Galato de Octila	75,3	±0,7
Galato de Nonila	57,9	±4,9
Galato de Decila	53,8	±1,5
Galato de Undecila	52,4	±1,2
Galato de Dodecila	52,7	±1,4
Galato de Tetradecila	63,3	±4,6

Através deste experimento foi possível verificar que os galatos apresentam toxicidade, representada pelo IC<sub>50</sub>, muito superior àqueles encontrados para o parasito *T. cruzi*.

Comparativamente ao que foi encontrado na toxicidade em *T. cruzi*, as substâncias apresentaram um comportamento muito semelhante, em que os galatos de heptila, octila e tetradecila apresentaram menor toxicidade, sendo que os galatos de nonila, decila, undecila e dodecila apresentaram a maior toxicidade. Seguindo a tendência observada na toxicidade para *T. cruzi*, o aumento da cadeia para galato de tetradecila também causou perda de atividade.

A representação gráfica da toxicidade sobre células metabolizadoras humanas HepG2 está apresentado na Figura 4.





**Figura 4.** Representação gráfica da toxicidade dos galatos sobre células metabolizadoras humanas (HepG2): Galatos de heptila (Hep), octila, (Oct), nonila (Non), decila (Dec), undecila (Und), dodecila (Dod) e tetradecila (Tet).

#### 6.5 Determinação do Índice de Segurança das substâncias (*Safety Index* – SI)

Os resultados do índice de segurança (SI) estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados de IC<sub>50</sub> (µM) em células HepG2, *T. cruzi* e índice de segurança(SI) das substâncias.

Substância	IC <sub>50</sub> HepG2	IC <sub>50</sub> Parasitos	Safety Index
Galato de Heptila	95,1	37,34	2,5
Galato de Octila	75,3	23	3,2
Galato de Nonila	57,9	2,9	19,9
Galato de Decila	53,8	1,5	35,8
Galato de Undecila	52,4	1,46	35,9
Galato de Dodecila	52,7	2,13	24,7
Galato de Tetradecila	63,3	17,63	3,6

Os resultados do índice de segurança (SI) apresentaram valores variáveis, mostrando uma maior segurança para os galatos de nonila, decila, undecila e dodecila. Testes com as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* são interessantes para essa avaliação.

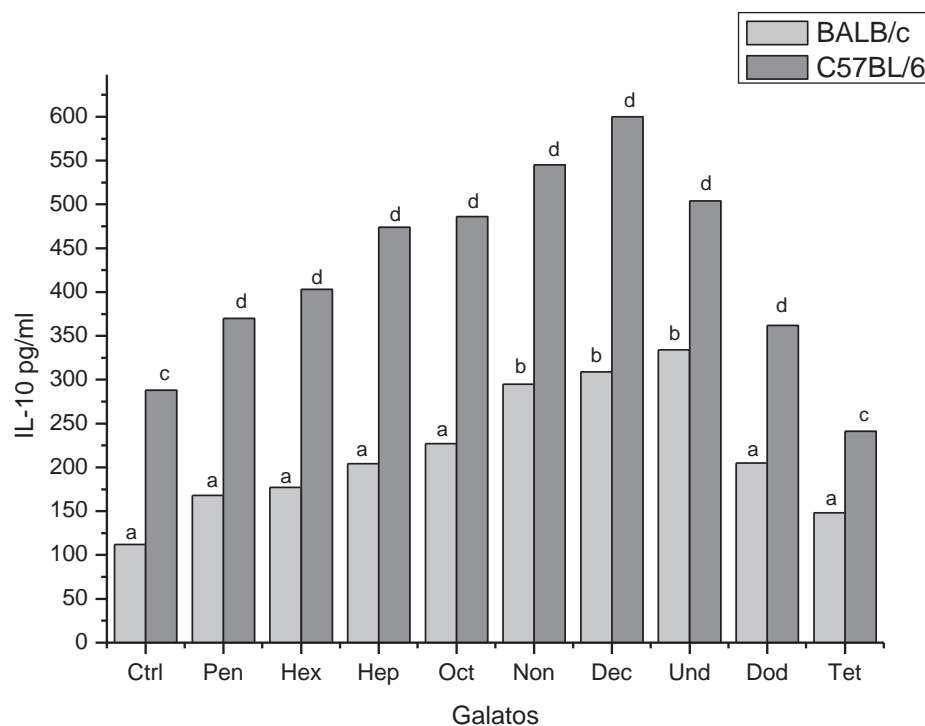
Estes resultados mostraram que estas substâncias possuem uma seletividade celular, o que indica serem possíveis candidatas para o combate à doença de Chagas.

### **6.6 Perfil de produção das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e TGF- $\beta$ , por macrófagos murinos incubados com os ésteres mais ativos em *T. cruzi***

Os macrófagos peritoneais murinos de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram incubados com as substâncias na concentração de 30  $\mu$ M. Esta concentração foi escolhida por ser aquela em que os macrófagos apresentaram viabilidade celular superior a 50%, em todas as substâncias testadas pelo método do azul de tripan, possibilitando então a avaliação do perfil de produção de citocinas antiinflamatórias, IL-10 e TGF- $\beta$ , e das citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , por macrófagos peritoneais murinos. Nestes experimentos também foram quantificadas as citocinas produzidas por macrófagos incubados com os galatos de pentila e hexila, que não apresentaram atividade contra *T. cruzi* a fim de avaliar uma possível influência na produção de citocinas pró e antiinflamatórias.

A análise estatística dos resultados foi efetuada utilizando o software Origin 7.0, para cálculo da média e desvio padrão, seguidos de análise de variância (ANOVA) e, teste Tukey, com limite de confiança de 95%. As variações na produção das citocinas foram comparadas em relação ao controle nas mesmas linhagens de camundongos.

A Figura 5 e Tabela 5 apresentam os resultados da produção de IL-10.



a, b, c, d Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes, em relação ao controle.

**Figura 5.** Perfil de produção da citocina IL-10 (pg/ml), por macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, incubados com os ésteres mais ativos: Galatos de pentila (Pen), hexila, (Hex), heptila (Hep), octila, (Oct), nonila (Non), decila (Dec), undecila (Und), dodecila (Dod), tetradecila (Tet) e controle (Ctrl).

**Tabela 5.** Produção de IL-10 (pg/ml) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico.

Substâncias	Camundongos BALB/c		Camundongos C57BL/6	
	Média	Desv. padrão	Média	Desv. padrão
Controle	112,33	±7,1	288,4	±17,6
Galato de pentila	167,85	±19,8	370,1	±22,3
Galato de hexila	177,22	±20,3	402,7	±16,4
Galato de heptila	204,46	±10,8	478,9	±8,8
Galato de octila	226,84	±20,8	485,5	±0,9
Galato de nonila	295,37	±37,7	544,8	±15,2
Galato de decila	308,56	±76,0	600,0	±28,9
Galato de undecila	333,89	±12,2	504,4	±17,4
Galato de dodecila	204,81	±4,4	361,8	±4,1
Galato de tetradecila	147,90	±42,2	240,5	±26,9

Da análise desses resultados foi possível observar um aumento mais acentuado na produção de IL-10 por macrófagos de camundongos C57BL/6 do que BALB/c. Este é um dado interessante, uma vez que, os camundongos BALB/c são conhecidamente mais suscetíveis à infecção por *T. cruzi* (WRIGHTSMAN et al., 1982; HOFT et al., 1993). Portanto, a quantidade desta citocina produzida nos controles negativos das duas linhagens também foi diferente; como observado, os macrófagos de C57BL/6 produziram maior quantidade de IL-10 do que os macrófagos de BALB/c.

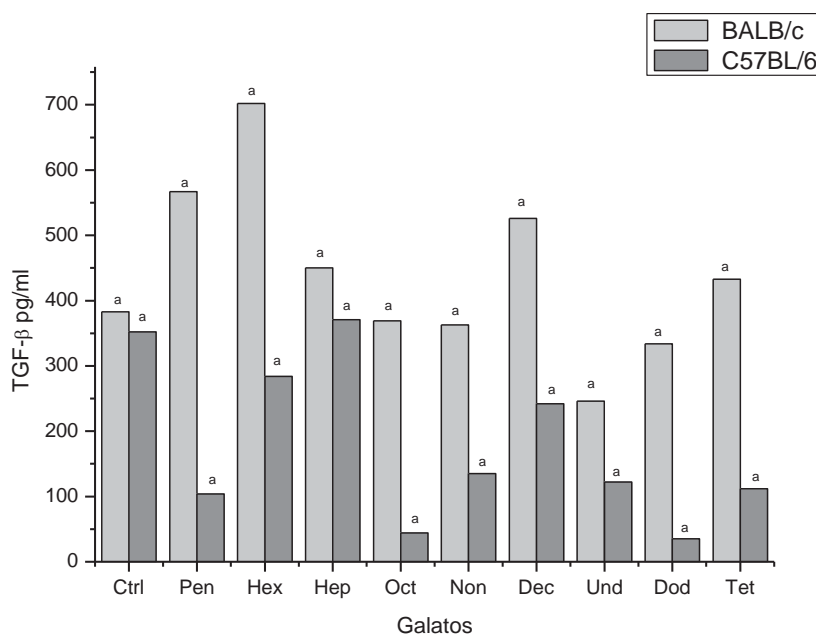
Para os macrófagos de camundongos BALB/c, apenas os galatos de nonila, decila e undecila promoveram uma produção de citocinas significativamente diferente do controle. Por outro lado, os macrófagos dos camundongos C57BL/6 apresentaram produção significativa para todas as substâncias em estudo, com exceção do galato de tetradecila.

Outro dado interessante foi o perfil de resposta que se mostrou relacionado ao tamanho da cadeia de carbonos das moléculas e a produção de IL-10, à semelhança do que foi observado na atividade tripanocida. A partir de galato de undecila, o aumento da cadeia carbônica não aumentou o efeito da atividade sobre *T. cruzi* e nem a produção de IL-10 em ambas as linhagens de camundongos. A avaliação estatística destes resultados mostrou que há

diferença significativa entre o perfil de produção de IL-10 nos macrófagos tratados e o controle.

A citocina IL-10 apresenta papel determinante na doença de Chagas, pois possui a função de suprimir a produção primária ou inibir os efeitos de IFN- $\gamma$  na infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 1992). O IFN- $\gamma$  é uma citocina capaz de ativar macrófagos e inibir a replicação do parasito (SILVA et al., 1991). Eventualmente, a associação de fármacos na doença de Chagas poderia ter um efeito mais interessante no controle da patologia devido a possibilidade de ocorrência de efeito sinérgico.

A Figura 6 e Tabela 6 apresentam os resultados das análises da citocina TGF- $\beta$ .



<sup>a</sup> Não houve diferença significativa de acordo com análise estatística, entre os resultados.

**Figura 6.** Perfil de produção da citocina TGF- $\beta$  (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, incubados com os ésteres mais ativos: Galatos de pentila (Pen), hexila, (Hex), heptila (Hep), octila, (Oct), nonila (Non), decila (Dec), undecila (Und), dodecila (Dod), tetradecila (Tet) e controle (Ctrl).

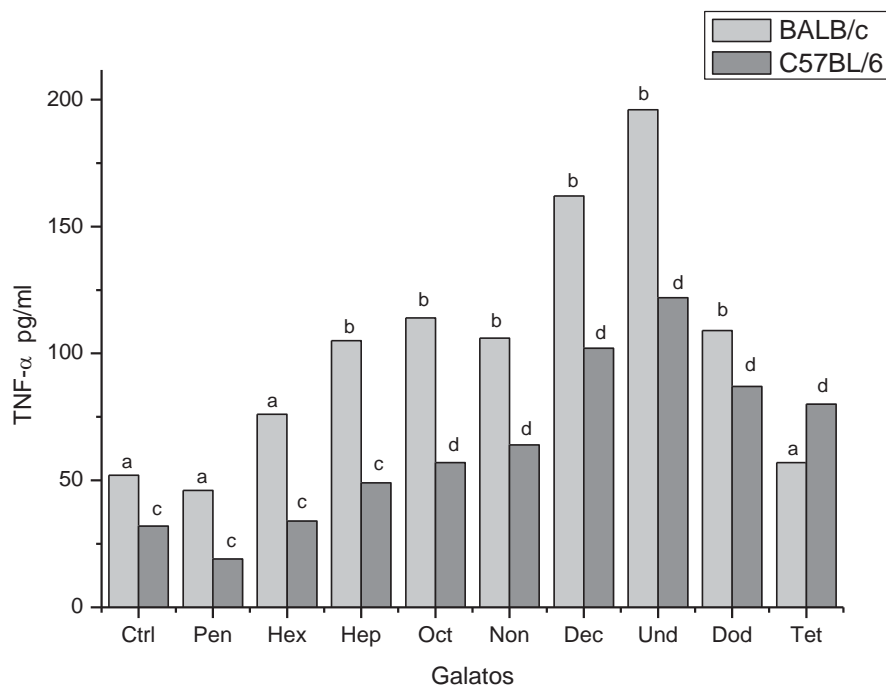
**Tabela 6.** Produção de TGF- $\beta$  (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico.

Substâncias	Camundongos BALB/c		Camundongos C57BL/6	
	Média	Desv. padrão	Média	Desv. padrão
Controle	382,9	$\pm 80,2$	352,2	$\pm 312,2$
Galato de pentila	567,4	$\pm 431,6$	104,4	$\pm 12,1$
Galato de hexila	702,3	$\pm 177,3$	284,2	$\pm 9,8$
Galato de heptila	450,2	$\pm 120,4$	371,3	$\pm 89,1$
Galato de octila	369,0	$\pm 217,4$	44,3	$\pm 55,0$
Galato de nonila	362,8	$\pm 77,9$	135,4	$\pm 33,6$
Galato de decila	525,8	$\pm 13,5$	242,0	$\pm 7,9$
Galato de undecila	245,9	$\pm 45,2$	121,9	$\pm 45,2$
Galato de dodecila	334,4	$\pm 4,2$	34,7	$\pm 37,8$
Galato de tetradecila	432,7	$\pm 63,0$	112,0	$\pm 63,0$

A análise estatística dos resultados para o TGF- $\beta$  demonstrou que não houve diferença significativa para a produção da citocina após incubação dos macrófagos com os galatos, comparativamente ao controle, conforme o gráfico apresentado na Figura 6.

TGF- $\beta$  possui a propriedade de diminuir o metabolismo oxidativo dos macrófagos, além de provocar uma diminuição da produção de outras citocinas (SILVA et al., 1991). O papel do TGF- $\beta$  na doença de Chagas pode tanto propiciar a replicação do parasito dentro do macrófago como bloquear a atividade inibitória do IFN- $\gamma$  (SILVA et al., 1991). Também se sabe que a produção de TGF- $\beta$  está possivelmente associada com o processo de fibrose cardíaca encontrado na doença de Chagas (ROSSI; BESTETTI, 1995).

A seguir, a Figura 7 e a Tabela 7 mostram os resultados dos testes para a citocina TNF- $\alpha$ .



a, b, c, d Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes, em relação ao controle.

**Figura 7.** Perfil de produção da citocina TNF- $\alpha$  (pg/mL), por macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, incubados com os ésteres mais ativos: Galatos de pentila (Pen), hexila, (Hex), heptila (Hep), octila, (Oct), nonila (Non), decila (Dec), undecila (Und), dodecila (Dod), tetradecila (Tet) e controle (Ctrl).

**Tabela 7.** Produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico.

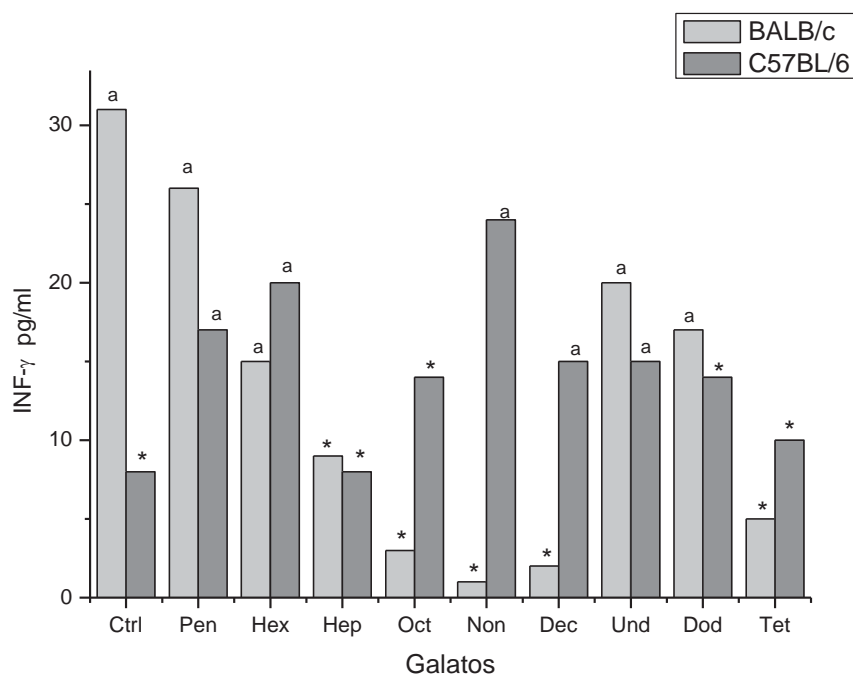
Substância	Camundongos BALB/c		Camundongos C57BL/6	
	Média	Desv. padrão	Média	Desv. padrão
Controle	51,8	$\pm 11,4$	32,1	$\pm 4,1$
Galato de pentila	45,5	$\pm 4,8$	19,4	$\pm 1,1$
Galato de hexila	76,3	$\pm 0,1$	34,1	$\pm 2,8$
Galato de heptila	104,5	$\pm 3,7$	48,6	$\pm 9,2$
Galato de octila	114,3	$\pm 5,0$	56,5	$\pm 3,8$
Galato de nonila	106,4	$\pm 9,5$	64,2	$\pm 1,9$
Galato de decila	161,7	$\pm 0,6$	101,6	$\pm 6,2$
Galato de undecila	196,1	$\pm 20,4$	122,2	$\pm 9,7$
Galato de dodecila	109,2	$\pm 11,7$	87,2	$\pm 1,6$
Galato de tetradecila	57,4	$\pm 6,3$	80,3	$\pm 2,3$

Analisando os dados, pode-se observar a ocorrência de efeito relacionado ao tamanho da molécula, sendo que TNF- $\alpha$  foi produzido em maior quantidade pelos macrófagos de BALB/c. Efeito semelhante foi observado na produção de IL-10 (Fig. 5, Tabela 5). Entretanto, a quantidade de citocinas produzidas foi diferente para cada linhagem, pois IL-10 apresentou maior produção em C57BL/6 e TNF- $\alpha$  em BALB/c. De modo semelhante, a partir do galato de dodecila também ocorreu uma redução na produção de TNF- $\alpha$  nas duas linhagens estudadas.

De Titto e colaboradores (1986), utilizando macrófagos murinos como células hospedeiras, observaram que a presença de TNF- $\alpha$  recombinante impediu a replicação do *T. cruzi*. Silva e colaboradores (1995), investigando o papel do TNF- $\alpha$  na resistência à infecção pelo *T. cruzi*, em linhagem de camundongos resistentes, observaram que a utilização de anticorpo monoclonal de TNF- $\alpha$  levou à susceptibilidade dos camundongos aos parasitos. Assim, este efeito na produção de TNF- $\alpha$  provocado pelos galatos parece ser interessante na modulação da infecção.

A seguir, a Figura 8 e a Tabela 8 mostram os resultados com a citocina IFN- $\gamma$ .





<sup>a</sup> Não houve diferença significativa entre os tratamentos, dentro de cada linhagem.

\* valores abaixo do limite de detecção do método.

**Figura 8.** Perfil de produção da citocina IFN- $\gamma$  (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, incubados com os ésteres mais ativos: Galatos de pentila (Pen), hexila, (Hex), heptila (Hep), octila, (Oct), nonila (Non), decila (Dec), undecila (Und), dodecila (Dod), tetradecila (Tet) e controle (Ctrl).

**Tabela 8.** Produção de IFN- $\gamma$  (pg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, mostrando a média de produção e o desvio padrão frente à incubação com os ésteres de ácido gálico.

Substância	Camundongos BALB/c		Camundongos C57BL/6	
	Média	Desv. padrão	Média	Desv. padrão
Controle	31,1	$\pm 1,5$	7,6	$\pm 1,4$
Galato de pentila	26,1	$\pm 13,2$	16,7	$\pm 13,2$
Galato de hexila	15,3	$\pm 0,7$	20,5	$\pm 10,7$
Galato de heptila	8,7	$\pm 8,5$	7,5	$\pm 7,8$
Galato de octila	3,3	$\pm 4,7$	14,3	$\pm 13,5$
Galato de nonila	0,5	$\pm 0,7$	23,9	$\pm 11,8$
Galato de decila	1,5	$\pm 2,2$	15,4	$\pm 4,2$
Galato de undecila	19,5	$\pm 5,2$	15,2	$\pm 2,7$
Galato de dodecila	16,9	$\pm 2,4$	14,0	$\pm 10,9$
Galato de tetradecila	5,3	$\pm 7,5$	10,0	$\pm 3,6$

O perfil observado para esta citocina diferiu bastante conforme as substâncias, não apresentando qualquer tipo de padrão, relativamente ao tamanho da molécula, à semelhança do que ocorreu com TGF- $\beta$ .

O IFN- $\gamma$  tem a capacidade de ativar macrófagos e inibir a replicação do *T. cruzi* tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (SILVA et al., 1991). Além disso, macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  são efetivos na inibição da replicação do *T. cruzi in vitro* e, acredita-se que esta atividade seja devida ao metabolismo oxidativo induzido por citocinas (SILVA et al., 1995).

Silva et al. (1991) também verificaram que macrófagos de camundongos resistentes (linhagem B6D2) e suscetíveis (linhagem B6) ao *T. cruzi*, tratados com IFN- $\gamma$  recombinante após 24 h do momento da infecção com *T. cruzi* apresentaram 100% de sobrevivência, sendo que os animais controle, tratados com salina, ou tratados com IFN- $\gamma$  após 7 dias do momento da infecção, apresentaram 100% de mortalidade.

De modo geral, o perfil de produção de citocinas mostrou-se diferente entre as linhagens de camundongos estudadas, conforme esperado. No entanto, chamou a atenção o fato de que a linhagem susceptível (BALB/c) apresentou menor produção da citocina antiinflamatória IL-10 e maior produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , em relação à linhagem resistente (C57BL/6). A maior produção de IL-10 inibiria os efeitos das citocinas

pró-inflamatórias  $IFN-\gamma$  e  $TNF-\alpha$ , que impediriam a replicação dos parasitos (SILVA et al., 1992).

Entretanto, este estímulo na produção de IL-10 provocado pelas substâncias, pode ser também um aliado no combate à Doença de Chagas. A ausência de IL-10 pode propiciar a ativação dos macrófagos e aumento das citocinas  $INF-\gamma$  e  $TNF-\alpha$ , que irão atuar inibindo a replicação do parasito, resultando em menor parasitemia; por outro lado, esta ausência pode provocar maior letalidade nos animais devido à ação destas citocinas pró-inflamatórias (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996; HUNTER et al., 1997). Por isso, este estímulo na produção de IL-10 pode colaborar com os importantes efeitos de  $TNF-\alpha$ , que também apresentou sua produção aumentada.

Nas duas linhagens, a quantificação das citocinas antiinflamatória e pró-inflamatória, IL-10 e  $TNF-\alpha$ , respectivamente, apresentaram um aumento na sua produção, estimulado pelos galatos, que acompanhou o aumento da cadeia carbônica lateral da molécula, assim como o que foi observado na atividade tripanocida e na citotoxicidade em células humanas, diminuindo o estímulo a partir de certo ponto, como no fenômeno de corte (KUBO et al., 1995; FUJITA; KUBO, 2002). Esse fato pode auxiliar no delineamento experimental de outros estudos sobre a ação dessas substâncias na doença.

O aumento ou diminuição na produção das citocinas IL-10 e  $TNF-\alpha$  por macrófagos peritoneais murinos das linhagens BALB/c e C57BL/6, incubados com as substâncias está resumido na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resposta na produção de citocinas, por macrófagos murinos incubados na presença das substâncias. Estão indicados o aumento (+) ou a diminuição (-) na produção da citocina em relação ao controle na mesma linhagem de camundongo.

Substâncias	BALB/c		C57BL/6	
	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-10	TNF- $\alpha$
Galato de pentila	+	-	+*	-
Galato de hexila	+	+	+*	+
Galato de heptila	+	+*	+*	+
Galato de octila	+	+*	+*	+*
Galato de nonila	+*	+*	+*	+*
Galato de decila	+*	+*	+*	+*
Galato de undecila	+*	+*	+*	+*
Galato de dodecila	+	+*	+*	+*
Galato de tetradecila	+	+	-	+*

\* Diferença significativa em relação ao controle da mesma linhagem.

### 6.7 Determinação do potencial apoptótico dos ésteres de ácido gálico em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Este ensaio realizado através da citometria de fluxo permitiu identificar alterações no potencial de membrana mitocondrial de parasitos tratados com os galatos comparativamente aos controles negativo (parasitos não-tratados) e positivo (pentamidina), uma vez que a redução no potencial de membrana mitocondrial é um indicativo de apoptose celular.

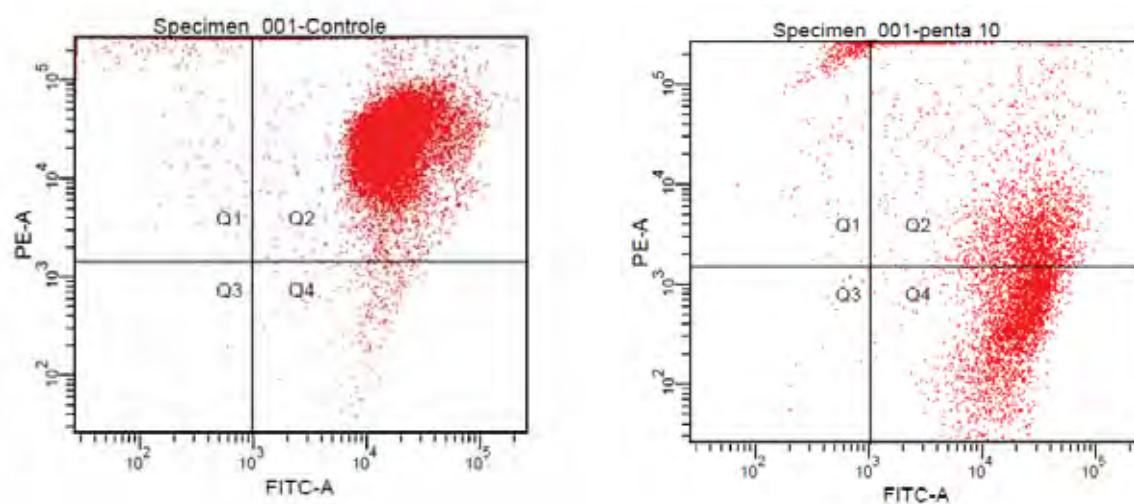
Os resultados dos experimentos estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Médias das taxas de apoptose (em %) de parasitos não tratados (controle negativo), tratados com os galatos e com pentamidina (controle positivo).

Substância	Não		
	Tratados	Tratados	Pentamidina
Galato de heptila	1,0	46,6	56,9
Galato de octila	1,0	43,6	56,9
Galato de nonila	1,0	5,9	56,9
Galato de decila	1,0	9,0	56,9
Galato de undecila	1,0	12,5	56,9
Galato de dodecila	1,0	13,4	56,9
Galato de tetradecila	1,0	53,2	56,9

Através dos resultados foi possível verificar uma diferença do potencial de membrana mitocondrial entre os parasitos tratados com pentamidina e o controle negativo, demonstrando a eficiência do método na detecção de apoptose, pois a pentamidina é, sabidamente, uma substância indutora de apoptose e que causa, uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial (SOUZA et al., 2009).

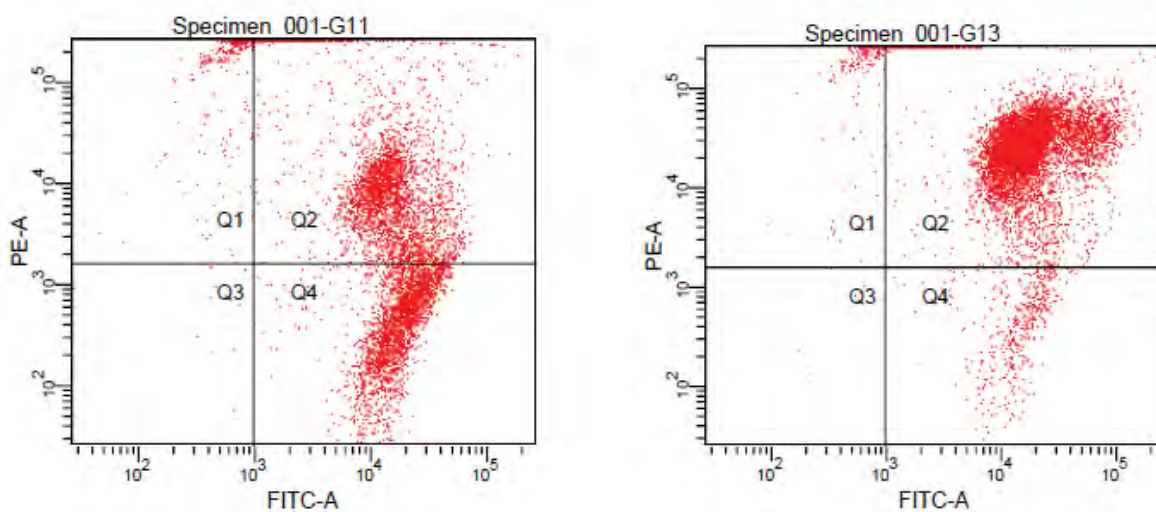
Os resultados de citometria de fluxo do controle negativo e positivo estão apresentados na Figura 9.



**Figura 9.** Análise de citometria de fluxo de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, mantidos sem tratamento (a) e tratados com 29,3  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) de pentamidina durante 72 horas (b).

A Figura 9 (a) mostra que as formas epimastigotas não tratadas (controle) apresentaram elevado potencial de membrana mitocondrial, o que pode ser observado pela elevada fluorescência detectada, representada na Figura 9 como eixo PE, indicando a maior presença de agregados. Na figura 9 (b) foi possível notar a perda de fluorescência, detectada no eixo PE, o que significa diminuição dos agregados, indicando apoptose dos parasitos.

A título de ilustração, os resultados da análise da citometria de fluxo dos parasitos incubados com o galato de heptila e galato de nonila estão apresentados na Figura 10.



**Figura 10.** Análise de citometria de fluxo de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, tratados com galato de heptila (a) e galato de nonila (b), durante 72 h.

A Figura 10 (a) mostra que as formas epimastigotas tratadas com galato de heptila apresentaram grande perda de seu potencial de membrana mitocondrial, o que pode ser observado pela perda de fluorescência detectada; ao contrario, os parasitos tratados com galato de nonila (figura 10b) apresentaram perda de fluorescência, indicando baixa taxa de apoptose.

Os resultados mostram que houve diferença no potencial de membrana mitocondrial dos parasitos tratados com os galatos e os não tratados (controle negativo), nas concentrações dos respectivos  $IC_{50}$ , sendo que as maiores taxas de apoptose, próximas a 50%, foram observadas com os parasitos tratados com os galatos de heptila, octila e tetradecila (galatos de octila e tetradecila, não mostrados).

Diferentemente do observado com a atividade tripanocida e citotoxicidade em células humanas, as substâncias mais ativas causaram uma menor taxa de apoptose, que eram

esperadas em torno de 50%, uma vez que a concentração das substâncias utilizada foi a mesma do IC<sub>50</sub>.

Uma possível explicação para este resultado pode ser o fato de que os ésteres com IC<sub>50</sub> mais baixos, dentre aqueles com melhor atividade tripanocida comparativamente ao benzonidazol (galatos de nonila, decila, undecila e dodecila), estejam atuando como um surfactante, interferindo na função das proteínas de membrana do parasito (KUBO et al., 1995; FUJITA; KUBO, 2002). Por outro lado, os ésteres menos ativos (galatos de heptila, octila e tetradecila) poderiam estar causando a inibição da biosíntese de ergosterol, que é essencial para a sobrevivência do parasito (SOUZA; RODRIGUES, 2009), conforme os resultados de Abe et al. (2000) que mostraram que alguns galatos possuem a propriedade de inibir a enzima esqualeno epoxidase, essencial no processo de biosíntese de ergosterol; e ainda que, inibidores de ergosterol, principalmente os da enzima esqualeno epoxidase, podem causar alteração no complexo cinetoplasto-mitocôndria do parasito (LAZARDI et al., 1990), o que certamente explica a elevada taxa de apoptose.

Os eucariotos possuem em sua membrana plasmática esteróis que são essenciais para a organização e função das membranas, decorrentes de uma longa evolução bioquímica (BLOCH, 1983). No entanto, existem diferenças entre os esteróis de membrana de eucariotos superiores e inferiores, sendo o principal na membrana de eucariotos superiores, o colesterol, enquanto que na membrana de eucariotos inferiores aparece o ergosterol, como em fungos e protozoários parasitos, como *Leishmania* e *Trypanosoma* (BLOCH, 1983; ARORA et al., 2004; ZINSER et al., 1991; MBONGO et al., 1998).



Conclusões



1. O ácido gálico puro não possui atividade tripanocida até a concentração máxima de 100 mg/mL;
2. As esterificações realizadas nesta molécula produziram substâncias de efeito tripanocida, sendo que algumas apresentaram atividade muito superior ao fármaco atualmente utilizado no combate à doença de Chagas, o benzonidazol.
3. O aumento da cadeia carbônica lateral nestes ésteres apresentou atividades diferentes, ou seja, a atividade tripanocida aumentou até uma cadeia lateral com 11 carbonos (galato de undecila), enquanto que cadeias laterais com mais de 11 carbonos (galatos de dodecila e tetradecila) apresentaram perda de atividade;
4. Os ensaios de toxicidade com células humanas (HepG2) permitiram concluir que os galatos apresentam maior toxicidade para os parasitos do que para essas células, possuindo, portanto, seletividade quanto ao tipo celular, o que é muito interessante para a prospecção de novos agentes terapêuticos;
5. A avaliação do perfil de produção de citocinas antiinflamatórias pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente, sensíveis e resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, revelou que camundongos C57BL/6 produzem maiores níveis da citocina IL-10 em relação à linhagem BALB/c, e que com exceção do galato de tetradecila, todos os outros galatos testados (galatos de pentila, hexila, heptila, octila, nonila, decila, undecila e dodecila) causaram um aumento na produção desta citocina. Na linhagem BALB/c, apenas os galatos de nonila, decila e undecila causaram aumento na produção de IL-10.
6. Quanto às citocinas pró-inflamatórias, verificou-se que camundongos BALB/c produziram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$ , em relação à linhagem C57BL/6.
7. Nas duas linhagens de camundongos a quantificação das citocinas antiinflamatória e pró-inflamatória, IL-10 e TNF- $\alpha$ , respectivamente, apresentou um aumento na produção, estimulado pelos galatos. Este estímulo na produção dos dois tipos de citocinas, pró e antiinflamatórias, parece ser muito importante, porque um fator complicador na doença de Chagas é a disparidade entre estes dois tipos de citocinas.
8. Os galatos provocaram mudança no potencial de membrana mitocondrial dos parasitos, evidenciando que essas substâncias causam apoptose nos parasitos, principalmente os galatos de heptila, octila e tetradecila. Esses resultados são indicativos de que a ação desses galatos, nos parasitos, ocorre por meio da inibição da biosíntese de ergosterol. O provável mecanismo de ação dos galatos de nonila, decila,

undecila e dodecila pode ser a ação surfactante sobre as proteínas da membrana do parasito.



# Referências

ABBAS, K. A.; LITCHMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. p. 239-258.

ABE, I.; KASHIWAGI, Y.; NOGUCHI, H. Inhibition of vertebrate squalene epoxidase by isoprenyl gallates and phenylalkyl gallates. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 10, p. 2525-2528, 2000.

ABE, I.; SEKI, T.; NOGUCHI, H. Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloyl esters. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 270, p. 137-140, 2000. Suppl. 1.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma and IL-12 regulate innate and acquired-immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, v. 84, p. 231-244, 1996.

AHUJA, S. S.; MUMMIDI, S.; MALECH, H. L.; AJUHA, S. K. Human dendritic cell (DC)-based anti-infective therapy: engineering DCs to secrete functional IFN-gamma and IL-12. **J. Immunol.**, v. 16, p. 868-876, 1998.

ALIBERTI, J. C. S.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P. M. P.; LANNES-VIEIRA, J. TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-g- and tumor necrosis factor-r1-deficient mice during *trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 4, 2001.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Brasília, DF: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 38-39.

ALVES, D. L.; SILVA, C. R. **Fitohormônios**: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002.

ARORA, A.; RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, p. 920-926, 2004.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. Jr.; FURNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' Disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 2034-2039, 2004.

BARILE, F. A.; DIERICKY, P. J.; KRISTEN, U. *In vitro* cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 10, n. 3, p. 155-162, 1994.

BARLA, F.; HIGASHIJIMA, H.; FUNAI, S.; SUGIMOTO, K.; HARADA, N.; YAMAJI, R.; FUJITA, T.; NAKANO, Y.; INUI, H. Inhibitive effects of alkyl gallates on hyaluronidase and collagenase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 73, p. 2335-2337, 2009.

BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

BD BIOSCIENCES. **BD™ MitoScreen**: instruction manual. Disponível em: <[http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/manuals/live/web\\_enabled/02-8100055-551302-Br.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/manuals/live/web_enabled/02-8100055-551302-Br.pdf)>. Acesso em: 17 mar. 2009.

BERNSTEIN, R. E. Darwin's illness: Chagas' Disease resurgens. **J. R. Soc. Med.**, v. 77, p. 608-609, 1984.

BLANCO, G. A.; BUSTAMANTE, J.; GARCIA, M.; HAJOS, S. E. Hydrogen peroxide induces apoptosis like cell death in coelomocytes of *Themiste petricola* (sipuncula). **Bio. Bull.**, v. 13, p. 34-48, 2005.

BLOCH, K. E. Sterol structure and membrane function. **CRC Crit. Ver. Biochem.**, v.14, p. 47-92, 1983.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' Disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BRODSKY, C. I.; BARRAL NETTO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 171-176.

BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium salt. **Planta Med.**, v. 68, p. 445-448, 2002.

BULLA, A. U.; SUAREZ, M. M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 392-394, 2004.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p.175-200, 1995.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAMARGOS, E. R. S.; FRANCO, D. F.; GARCIA, C. M. M. G.; DUTRA, A. P.; TEIXEIRA, A. L.; CHIARI, E.; MACHADO, C. R. S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 604-612, 2000.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas' Disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002. Suppl. 1.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: role of NK cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p.128-134, 1996.

CAVALCANTI, M. B.; AMARAL, A. J.; FERNANDES, T. S.; MELO, J. A.; MACHADO, C. G. F. p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. **Mol Cell Biochem.**, v. 308, p. 127-131, 2008.

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

CHIARI, E.; RASLAN, D. S.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* screening of *Asteraceae* plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytother. Res.**, n.10, p. 636-638, 1996.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARAGIOTTO, M. H. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Quím. Nova**, v. 26, p. 825-827, 2003.

- COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cationic 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 197, p. 40-45, 1993.
- COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.**, v. 18, p. 703-711, 2009.
- CROFT, S. L.; BRAZIL, R. P. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania Mexicana amazonensis* *in vitro*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, p. 37-43, 1982.
- CROFT, S. L.; WALKER, J. J.; GUTTERIDGE, W. E. Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes *in vitro*. **Trop. Med. Parasitol.**, n. 39, p.145-148, 1988.
- DEBRABANT, A.; LEE, N.; BERTHOLET, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 257-267, 2003.
- DE TITTO, E. H.; CATERALL, J. R.; REMINGTON, J. S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 137, p. 1342-1345, 1986.
- DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAÚJO, R. F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ARAS, R. Acute Chagas Disease outbreak associated with oral transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, p. 296-300, 2008.
- DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol. Int.**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.
- DUTTA, A.; GHOSHAL, A.; MANDAL, D.; MONDAL, N. B.; BANERJEE, S.; SAHU, N. P.; MANDAL, C. Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1196-1204, 2007.

FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' Disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 1359-1364, Apr. 2007.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' Disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 755-759, 1987.

FRANKLIN, B. S. **Correlação do fenótipo de resistência do *Trypanosoma cruzi* a drogas com o mecanismo de escape à ação antimicrobiana do IFN- $\gamma$  em fibroblastos humanos.** 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2005.

FREY, C.; PAVANI, M.; CORDANO, G.; MUÑOZ, S.; RIVERA, E.; MEDINA, J.; MORELLO, A.; MAYA, J. D.; FERREIRA, J. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 146, p. 520-527, 2007. Suppl. 4.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 79, p. 193-201, 2002. Suppl. 3.

GALI, H. U.; PERCHELLET, E. M.; PERCHELLET, J. P. Inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis *in vivo*. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2820-2825, 1991.

GALI, H. U.; PERCHELLET, E. M.; KLISH, D. S.; JOHNSON, J. M.; PERCHELLET, J. P. Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo*. **Int. J. Cancer**, v. 51, p. 425-432, 1992.

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



GIFTSON, J. S.; JAYANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Invest. New Drugs**, v. 28, p. 251-259, 2009.

GUEVARA, P.; DIAS, M.; ROJAS, A.; CRISANTE, G.; ABREU-BLANCO, M. T.; UMEZAWA, E.; VAZQUEZ, M.; LEVIN, M.; AÑEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. **J. Med. Entomol.**, v. 42, n. 1, p. 48-56, 2005.

GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunol.**, v. 31, p. 673-685, 2009.

HENTZER, B.; KOBAYASI, T. The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 71, p. 157-166, 1977.

HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 151, n. 12, p. 7038-7047, 1993.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, p. 1018-1027, 2007.

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 158, p. 3311-3316, 1997.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; KOIDE, T.; SAKAGUCHI, N.; OGIHARA, Y.; YABU, Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 204, n. 2, 898-904, 1994.

JANKOVIC, D.; SHER, A.; YAP, G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 403-409, 2001.

JAVITT, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. **FASEB J.**, v. 4, p. 161-168, 1990.

- KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Med.**, v. 3, p. 614-620, 1997.
- KUBO, I. Molecular design of antioxidative and antimicrobial agents. **Chemtech**, v. 29, p. 37-42, 1999.
- KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; MASUOKA, N. Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 573-580, 2003.
- KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M.; KUBO, A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 3, p. 873-880, 1995.
- KULKARNI, G. V.; LEE, W.; SETH, A.; McCULLOCH, C. A. G. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. **Exp. Cell. Res.**, v. 245, p. 170-178, 1998.
- LARGERON, M.; LOCKHART, B.; PFEIFFER, B.; FLEURY, M. B. Synthesis and *in vitro* evaluation of new 8-amino-1,4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 5043-5052, 1999.
- LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. de. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p. 2097-2105, 1990.
- LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA JÚNIOR., J. M.; AMBRÓSIO, D. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICALLELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Nat. Prod. Res.**, v. 22, p. 1040-1046, 2008.
- LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTYPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Euk. Cell.**, v. 1, p. 495-502, 2002.
- MACHADO JUNIOR, J. C.; FLORÃO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 16, p. 645-655, 2006.

- MADLENER, S.; ILLMER, C.; HORVATH, Z.; SAIKO, P.; LOSERT, A.; HERBACEK, I.; GRUSCH, M.; ELFORD, H. L.; KRUPITZA, G.; BERNHAUS, A.; FRITZER-SZEKERES, M.; SZEKERES, T. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 245, p. 156-162, 2007.
- MANSOUR, H. B.; BOUBAKER, J.; BOUHLEL, I.; MAHMOUD, A.; BERNILLON, S.; CHIBANI, J. B.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antigenotoxic activities of crude extracts from *Acacia salicina* leaves. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 48, n. 1, p. 58-66, 2007.
- MARTINS FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E. S.; CARVALHO, J. F.; CANCADO, J. R.; BRENER, Z. Flow Cytometry, a new approach to detect anti-live Trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' Disease. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 5, p. 569-573, 1995.
- MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 1, p. 1-15, 2007.
- MBONGO, N.; LOISEAU, P. M.; BILLION, M. A.; ROBERT-GERO, M. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 352-357, 1998.
- MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increase pentamidine cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 11798-11813, 2004.
- MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMULLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, p. 329-340, 2004.
- MEYER, H. The fine structure of the flagellum and the kinetoplast-chondriome of *Trypanosoma* (*Schyzotrypanum*) *cruzi* in tissue culture. **J. Protozool.**, v. 15, p. 614-621, 1968.
- MEYER, H.; MUSACCHIO, M. O.; ANDRADE-MENDONÇA, M. I. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and of blood agar forms. **Parasitology**, v. 48, p. 1-8, 1958.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas Disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009. Suppl. 1.

MORELO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 107, n. 3, p. 367-371, 1994.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA JUNIOR., J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Med.**, v. 75, p. 620-623, 2009.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of American plants extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 101-107, 2000.

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SAHANI, M. H.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, p. 1-10, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NUNES, R. K. **Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense**. 2008. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; CHIARI, E. Trypanocidal Sesquiterpenes from *Lychnophora* Species. **Phytother. Res.**, v. 10, p. 292-295, 1996.

PETRAY, P.; ROTTENBERG, M. E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, v. 16, p. 193-199, 1994.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN NETO, J. A. Chagas' Disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REGASINI, L. O.; SILVA, F. C.; BOLZANI, V. S.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 19, p. 199-203, 2009.

REIS, G. A. dos. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Today**, v. 13, p. 335-342, 1997.

RENESTO, P.; CRAPOULET, N.; OGATA, H.; LA SCOLA, B.; VESTRIS, G.; CLAVERIE, J.; RAOULT, D. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whipplei*. **Lancet**, v. 362, p. 447-449, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 161-178.

RIARTE, A.; LUNA, C.; SABATIELLO, R.; SINAGRA, A.; SCHIAVELLI, R.; RISSIO, A.; MAIOLO, E.; GARCIA, M. M.; JACOB, N.; LAURICELLA, M.; SEGURA, E. L.; VAZQUEZ, M. Chagas' Disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 561-567, 1999.

ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; ELÓI-SANTOS, S. M.; CARVALHO, A. T.; CORRÊA OLIVEIRA, R.; MARQUES, M. J.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; MARTINS FILHO, O. A. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania braziliensis* detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 6, p. 551-562, 2002.

RODRIGUES, J. C. F.; SOUZA, W. de. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes metabolic inhibitors. **Cur. Pharm. Des.**, v. 14, p. 925-938, 2008.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 28, p. 421-428, 2002.

ROMAGNANI, S. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response? **Immunol. Today**, v. 13, p. 379-381, 1992.

ROSSI, M.; BESTETTI, R. B. The challenge of chagasic myocardopathy. **Cardiology**, v. 86, p. 1-7, 1995.

RUIZ, P. G.; GARAVITO, G.; ACEBEY, C. L.; ARTEGA, L.; PINZON, R.; GIMENEZ, T. A. Actividad leishmanicida y trypanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia. **Biofarbo**, v. 12, p. 27-30, 2004.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, p. 625-634, 1985.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 17, p. 455-465, 2007. Suppl. 3.

SCARANO, F. R. Perspectives on biodiversity science in Brazil, Piracicaba. **Sci. Agric.**, v. 64, n. 4, 2007.

SCHIJMAN, A. G.; VIGLIANO, C. A.; VIOTTI, R. J.; BURGOS, J. M.; BRANDARIZ, S.; LOCOCO, B. E.; LEZE, M. I.; ARMENTI, H. A.; LEVIN, M. J. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 210-220, 2004.

SEN, N.; MAJUMDER, H. K. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, p. 839-846, 2008.

SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl Gallates, intensifiers of B-Lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 549-555, 2005. Suppl. 2.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 539-545, 1991.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N. R.; CARDOSO, M. A. G.; ALIBERTI, J. C. S.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 12, p. 4862-4867, 1995.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PADUA, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 111-115, 1998.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and Interferon- $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 11-22, 1994.

SOUZA, W. de; CAVALCANTI, D. P. DNA containing organelles in pathogenic protozoa. **Trends Cell. Mol. Biol.**, v. 2, p. 89-104, 2008.

SOUZA, W. de; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdiscip. Perspect Infect. Dis.**, v. 2009, p. 1-19, 2009.

SOUZA, W. de; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 2069-2080, 2009.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M. H. de; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M.; CARVALHO-PINTO, C. J. de; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosomacruzi* isolated from humans, vectors and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas Disease in Santa Catarina state, Brazil. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 60, p. 25-32, 2008.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Cytotoxic molecules from natural sources tapping the Brazilian biodiversity. **Anti-cancer Agents Med. Chem.**, v. 6, n. 4, p. 367-75, 2006.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' Disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, p. 400-419, 1992.

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today**, v. 11, p. 7-9, 1995.

UCHÔA, E.; FIRMO, J. O. A.; DIAS, E.; PEREIRA, M. S.; GONTIJO, E. Signos, significados e ações associados à doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 71-79, 2002.

VAN DER MEEREN, H. L. Dodecyl gallate, permitted in food, is a strong sensitizer. **Contact Dermatitis**, v. 16, p. 260-262, 1987.

VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F.; VRAY1, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4033-4040, 1999.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Bas. Apl.**, v. 27, p. 1-7, 2006.

VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. **Biochem. J.**, v. 284, p. 463-467, 1992.

VICKERMAN, K.; COOMBS, G. H. Protozoan paradigms for cell biology. **J. Cell. Sci.**, v. 112, p. 2797-2798, 1999.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases. **BMJ**, v. 325, p. 176-177, 2002.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; TSAI, H. L. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chem.**, v. 79, p. 307-313, 2002.

WOLF, S. F.; TEMPLE, P. A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R. M. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J. Immunol.**, v. 146, n. 9, p. 3074-3081, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas' Disease (American trypanosomiasis)**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. **Infect. Immun.**, v. 36, n. 2, p. 637-644, 1982.



ZINSER, E.; SPERKA-GOTTLIEB, C. D. M.; FASCH, E. V.; KOHLWEIN, S. D.;  
PALTAUF, F.; DAUM, G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular  
membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 173,  
p. 2026-2034, 1991.



# Apêndices

- **Apêndice 1**

**Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)**

68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 111 mM Dextrose (Mallinckrodt); 0,3% *Liver Infusion Broth* (Sigma); 0,5% *Tryptose* (Sigma), acertar o pH para 7,2 e o volume com água q.s.p 900 mL seguido de autoclavação. Imediatamente antes do uso, adicionar 25 mg/L de *Haemin* (Sigma) e 10% de Soro Fetal Bovino estéril.

- **Apêndice 2**

**Solução MTT/PMS**

2,5 mg/mL de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) e 0,22 mg/mL de PMS (Phenazine methosulfate) (Sigma).

- **Apêndice 3**

**Tampão Fosfato Estéril (PBS) 10X**

80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, completando para 1 L com água destilada. No momento do uso, acertar a concentração para 1X e o pH em 7,2.

- **Apêndice 4**

**Meio RPMI – 1640**

10,4 g de RPMI – 1640(Sigma) em 1L de Água Mili-Q, acrescentando-se 2,38 g de HEPES 10 mM, e 2g de Bicarbonato de Sódio. Ajustar o pH entre 7,0 – 7,2. Filtrar em membrana 0,2 µm estocando-se a 4 °C.

**RPMI – 1640 Completo**

No momento do uso, para cada 1 mL de meio RPMI-1640, adicionar 1 µL dos seguintes constituintes: Penicilina (Sigma) 100 U/mL, esterilizada por filtração, Estreptomicina (Sigma) 100 µg/mL, esterilizada por filtração, β-mercaptoetanol 5x10<sup>-2</sup> M, Soro Fetal Bovino (inativado) a 5%.

**β-mercaptoetanol (2-ME) 5x10<sup>-2</sup> M**

Para cada 14,32 M de 2-ME (35 µL), adicionar 9,965 mL de Água Mili-Q (Concentração ideal para a técnica de cultura de macrófagos) esterilizado por filtração.

- **Apêndice 5**

**Solução MTT/RPMI-1640**

10 mg de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) diluído em 2 ml de tampão fosfato estéril 1x mais 8 mL de RPMI-1640.

- **Apêndice 6**

**Azul de trypan**

0,4 g do pó de azul de trypan

100 mL de soro fisiológico(solução NaCl 0,9%)

- **Apêndice 7**

**MEM**

10 g de MEM

1,5 mg de bicarbonato de sódio

1 Litro de Água

- **Apêndice 8**

**Tripsina**

0,025% de tripsina

0,01% de EDTA

Diluir em PBS (1x) estéril.

- **Apêndice 9**

**Solução MTT/MEM**

10 mg de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma), diluído em 2 mL de tampão fosfato estéril mais 8 mL de MEM (sem adição de Soro fetal bovino).