

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

**POTENCIAL QUIMIOTERAPÊUTICO DE DIFERENTES
DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO PARA O TRATAMENTO DA
INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*:
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

IRIANE EGER

**FLORIANÓPOLIS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

**POTENCIAL QUIMIOTERAPÊUTICO DE DIFERENTES
DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO PARA O TRATAMENTO DA
INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*:
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

IRIANE EGER

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

**FLORIANÓPOLIS
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

E29p Eger, Iriane

Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* [tese] : avaliação in vitro e in vivo / Iriane Eger ; orientador, Mário Steindel. - Florianópolis, SC, 2010.
105 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

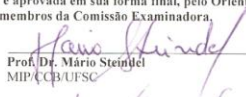
1. Biotecnologia. 2. Atividade tripanocida. 3. Galatos. 4. Chagas, Doença de. 5. *Tripanotona reductase*. I. Steindel, Mario. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

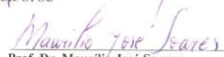
**Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados
do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo
Trypanosoma cruzi: avaliação *in vitro* e *in vivo***
POR
Iriane Eger

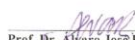
Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e
membros da Comissão Examinadora,

Orientador:

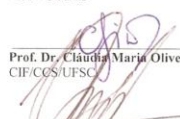

Prof. Dr. Mário Steinjohel
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Maurílio José Soares
Instituto Carlos Chagas, Fiocruz


Prof. Dr. Alvaro José Romanha
PPG em Biotecnologia/CCB/UFSC


Prof. Dr. Luiz Cláudio Milletz
CAV/UESC


Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões
CIF/CCS/UFSC

Prof. Dr. Edmundo Carlos Geisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia/CCB/UFSC
Florianópolis, Agosto de 2010

*Aos milhões de chagásicos, que
esperam da Ciência muito mais
do que uma molécula
promissora*

AGRADECIMENTOS

Ao final desta etapa meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Mario Steindel, orientador, amigo e eterno idealizador de uma Universidade cada vez melhor, cuja curiosidade científica é fonte de inspiração e motivação;

Aos Professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FAPESC;

À Univali, nas pessoas do Prof. Márcio Vieira Angelo, coordenador do curso de Medicina; Prof^ª. Arlete Soprano, diretora do CCS e Prof. Valdir Cechinel Filho, pelo apoio e confiança; ao Prof. Marcel Frajblat, pelo ágil fornecimento dos camundongos; ao Prof. Rilton Freitas, pelas colaborações e projetos em parceria; aos funcionários Arnaldo, Flávia, Luiza, Marilisa, Sônia e Tatiana e, principalmente a Prof^ª. Darlene, amiga e companheira leal;

Aos funcionários do Depto de Microbiologia e Parasitologia, sobretudo à Joice, sempre prestativa e atenta às nossas pendências; à Fátima pelo cuidado com os animais de experimentação e ao Edinaldo pelo saboroso e animador cafezinho;

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do CCB, Bibiana e Denis, pela disponibilidade e atenção;

À Prof^ª. Zenilda e seu doutorando Heder, à Eliane do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e, sobretudo ao Dr. Maurílio José Soares, do ICC/Fiocruz, pelo valioso auxílio no processamento e análise do material para a microscopia eletrônica;

Ao Prof. Marcelo Farina, do Laboratório de Neuroquímica, pelo inestimado auxílio nos ensaios de inibição enzimática;

Ao Prof. Marcelo Maraschin, do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (CCA), sempre prestativo nas nossas tentativas de dosagem de ergosterol;

Ao Prof. Ricardo Nunes, do Laboratório de Síntese e Atividade (QMC) e seus estudantes pela síntese e modificações estruturais dos compostos;

Aos professores Adair Roberto dos Santos, Cláudia Maria Oliveira Simões, Edmundo Carlos Grisard e Jamil Assreuy Filho, membros da minha banca de qualificação de doutorado, assim como ao Prof. André Bafica, pelas valiosas sugestões e críticas, que certamente contribuíram para esta tese;

Aos professores Álvaro Romanha e Carlos Zanetti, pelas agradáveis discussões científicas, filosóficas e existenciais, pelo olhar atencioso e compreensivo ante a nossa ansiedade imatura;

Agradeço também ao valioso e imprescindível auxílio dos colegas Álvaro e Jonatan, pelas histologias; Darlene, Larissa e Lucas pelas PCR's e RT-qPCR; à Patrícia, pela clonagem e expressão da TcTR e ao Glauber, pelo socorro imediato e preciso ante às ciladas do Windows;

Ao coleguismo, companheirismo e várias “mãozinhas” dos demais estudantes do Laboratório de Protozoologia, atuais e passados, que entre tantos se torna difícil nomear, mas agradeço a todos, pois cada um deixou uma lembrança;

Aos meus alunos de iniciação científica da Univali, especialmente ao Gustavo e a Rafaela, que participaram diretamente na execução parcial deste estudo;

Às grandes e inesquecíveis amigas: Alessandra, Bibiana, Daiene, Ingridzinha, Mônica, Rúbia, Thais e Viviane, que do seu modo e ao seu alcance fizeram por mim muito mais do que podem imaginar;

Aos estimados Juca e Livinha, pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos;

À grande família Eger, principalmente aos meus pais Quirino e Herta, por razões que vão além das palavras;

Ao Dilvo, surpresa agradável e inesperada durante o doutorado, pelo amor, carinho, amizade, pela ordem em meio ao caos, pela tranquilidade em meio ao turbilhão, pelo suave contra-ponto;

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial tripanocida *in vitro* e *in vivo* do ácido gálico e derivados (galatos de octila, decila, undecila, dodecila e tetradecila). O efeito tripanocida *in vitro* foi avaliado contra formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Os galatos de octila, dodecila e tetradecila reduziram em 50 a 60% a viabilidade de tripomastigotas sanguíneos (cepaY) na concentração de 50 μM . Entretanto, nenhum deles foi mais ativo do que o quimioprolifático violeta de genciana. Contrariamente, todos os ésteres de galato foram mais ativos *in vitro* do que o benzonidazol contra formas amastigotas intracelulares das cepas Y e Colombiana, com percentuais de inibição (PI) variando entre 46 a 95% na concentração de 3 μM . Entretanto, os galatos foram mais citotóxicos do que o benzonidazol, sendo que somente o galato de dodecila apresentou índice de seletividade (IS) acima de 50. O uso combinado desse composto com o benzonidazol mostrou um efeito aditivo *in vitro* contra amastigotas intracelulares. A análise ultraestrutural por MET mostrou que o galato de dodecila induziu alterações morfológicas em epimastigotas e em amastigotas intracelulares, com expressiva perda de conteúdo citoplasmático e número de reservossomos, intumescimento da mitocôndria, mas sem alteração do cinetoplasto. Ensaios de inibição *in vitro* com a tripanotiona redutase recombinante de *T. cruzi* (TcTR) mostraram que o ácido gálico inibiu esta enzima ($\text{CI}_{50} = 45,6 \mu\text{M}$) sem interferir na atividade da glutatona redutase (GR). Contrastando com a potente atividade tripanocida *in vitro*, nenhum dos compostos suprimiu a parasitemia e preveniu a mortalidade de camundongos em fase aguda e crônica da tripanosomíase. Entretanto, a análise histopatológica mostrou que a maioria dos animais tratados com o ácido gálico ou com o galato de dodecila apresentou tecido cardíaco íntegro sem focos inflamatórios. A análise por RT-qPCR do perfil de citocinas transcritas no coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana mostrou menor taxa de IFN- γ no grupo tratado com o galato de dodecila, sugerindo uma participação na imunomodulação do processo inflamatório. Conclui-se que os galatos testados apresentaram um potente efeito tripanocida *in vitro* e, embora não tenham modificado os cursos da infecção experimental aguda e crônica, podem ter uma participação no controle da inflamação tecidual via imunomodulação negativa do IFN- γ .

Palavras-chave: atividade tripanocida, galatos, doença de Chagas experimental, tripanotiona redutase.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the potential trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo* of gallic acid and five esters (octyl, decyl, undecyl, dodecyl and tetradecyl gallate). The *in vitro* trypanocidal activity of the compounds was evaluated against blood trypomastigotes and intracellular amastigotes of *T. cruzi*. Incubation of mice infected blood (Y strain) for 48 hours with octyl, dodecyl and tetradecyl gallates at 50 μM revealed a trypanocidal effect higher than 50%, which was, however, lower than the trypanocidal effects exhibited by gentian violet. In contrast, all gallate esters showed a higher *in vitro* activity than benzonidazole against intracellular amastigotes of both the Y and Colombiana strains, with percentages of inhibition (PI) ranging from 46 to 95% at 3 μM . However, most of the gallic acid derivatives showed significant cytotoxic effects, with the exception of dodecyl gallate which presented a selectivity index (SI) higher than 50. Moreover, the use of dodecyl gallate + benzonidazole showed also an additional *in vitro* effect against intracellular amastigotes. The ultrastructural analysis by transmission electron microscopy (TEM) showed that the treatment with dodecyl gallate induces drastic morphological changes in both the epimastigotes and intracellular amastigotes. This effect is characterized by a significant loss of cytoplasmic content, reduction of the reservosome numbers, mitochondria swelling and no kinetoplasmic change. *In vitro* assays revealed that gallic acid specifically inhibited the *T. cruzi* recombinant trypanothione reductase (*Tc*TR) ($\text{IC}_{50} = 45.6 \mu\text{M}$). In contrast to the powerful trypanocidal activity *in vitro*, none of the compounds were able to suppress parasitemia or prevent the mice mortality at the acute and chronic phases of trypanosomiasis. However, histopathological analysis showed that the most of the mice treated with gallic acid and dodecyl gallate showed no inflammatory foci in the heart. The RT-qPCR analysis for cytokine profile in the heart tissue of infected mice with the Colombiana strain revealed a lower rate of IFN- γ in the group treated with dodecyl gallate, suggesting a possible role of this compound in the immune modulation of the inflammation. We conclude that the gallates tested showed a potent trypanocidal effect *in vitro* and, although they have not changed the course of acute and chronic experimental infection may be involved in the control of tissue inflammation through negative immune modulation of IFN- γ .

Keywords: trypanocidal activity, gallates, experimental Chagas' disease, trypanothione reductase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação catalisada pela tripanotona redutase.....	17
Figura 2. Comparação entre as estruturas da glutatona e tripanotona, substratos da GR e TR, respectivamente.....	17
Figura 3. Estruturas químicas dos compostos testados (ácido gálico e seus ésteres) e dos controles de atividade tripanocida, benzonidazol e violeta de genciana.....	21
Figura 4. Estrutura química da clomipramina e da carmustina (Becenun® - BCNU), inibidores das enzimas tripanotona redutase e glutatona redutase, respectivamente.....	21
Figura 5. Mecanismo esquemático da re-oxidação de tripanotona reduzida (T[S] ₂) mediada pelo DTNB.....	29
Figura 6. Atividade antiparasitária dos ésteres de galato frente a amastigotas das cepas Y (barras escuras) e Colombiana (barras claras) de <i>Trypanosoma cruzi</i> em células Vero.....	39
Figura 7. Atividade tripanocida do ácido gálico e do galato de dodecila sobre formas amastigotas em células Vero.....	40
Figura 8. Atividade tripanocida do ácido gálico e do galato de dodecila sobre formas amastigotas em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos Balb/c.....	41
Figura 9. Avaliação do efeito tripanocida isolado e combinado do galato de dodecila e do benzonidazol.....	43
Figura 10. Análise do efeito combinado do galato de dodecila (GD) e do benzonidazol (BZ), segundo o programa CompuSyn®.....	43
Figura 11. Alterações ultraestruturais em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> induzidas pelo galato de dodecila após 48h de incubação.....	45
Figura 12. Alterações ultraestruturais em formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em células Vero induzidas pelo galato de dodecila após 48h de incubação.....	46
Figura 13. SDS-PAGE (painel A) e western blot (painel B) da tripanotona redutase heteróloga de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
Figura 14. Teste de atividade da TcTR após a purificação e padronização da concentração enzimática para os ensaios de inibição..	48
Figura 15. Triagem dos compostos com potencial inibitório da TcTR.	49
Figura 16. Determinação da CI ₅₀ do inibidor clomipramina (painel A) e do galato de decila (painel B) para TcTR.....	49
Figura 17. Avaliação do efeito inibitório do ácido gálico sobre a TcTR (barras escuras) comparado com a GR (barras claras).....	50

Figura 18. Efeito do tratamento agudo (<i>clearance</i>) dos galatos sobre a parasitemia de camundongos Swiss em fase aguda da infecção com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Figura 19. Efeito dos galatos sobre a parasitemia de camundongos Swiss infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> ao longo de sete dias de tratamento, iniciado 24 horas após a infecção.....	52
Figura 20. Perfil temporal da positividade de hemoculturas de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> realizadas 60 dias após o término do tratamento experimental.....	57
Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% representativa do produto de PCR de sangue periférico de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento experimental.....	57
Figura 22. Corte histológico de tecido cardíaco de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> 60 dias após o término do tratamento experimental.....	59
Figura 23. Corte histológico representativo de tecido muscular esquelético (A, B) e cardíaco (C-E) de camundongos Swiss após três meses de infecção com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ao tratamento experimental.....	60
Figura 24. Perfil de transcrição gênica no tecido cardíaco de camundongos Swiss após três meses de infecção com a cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> ao longo de 21 de tratamento.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Oligonucleotídeos selecionados para a RT-qPCR e o peso molecular esperado para cada um dos amplicons.....	35
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade tripanocida <i>ex vivo</i> frente a formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Tabela 2. Efeito dos ésteres de galato, expresso como CI ₅₀ sobre formas amastigotas intracelulares das cepas Y e Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> e índice de seletividade (IS) em relação a células Vero.....	40
Tabela 3. Atividade tripanocida de galatos comerciais frente a amastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos derivados de medula óssea.....	41
Tabela 4. Avaliação da mortalidade de camundongos Swiss infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> submetidos a dois esquemas terapêuticos com diferentes galatos administrados pela via oral, monitorada até o 30º dia pós-tratamento.....	53
Tabela 5. Efeito do tratamento isolado e combinado do galato de dodecila e benzonidazol sobre a sobrevivência e cura parasitológica de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
Tabela 6. Achados histopatológicos em cortes seriados de coração e músculo esquelético de camundongos cronicamente infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento experimental.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS- síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC- *American Type Culture Collection*
BCNU- Becenun® (carmustina)
CI₅₀- concentração que inibe 50% do crescimento celular
Ct- *cycle threshold*
CTNBio- Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
D.O.- densidade óptica
DEPc- dimetil pirocarbonato
DL₅₀- dose letal a 50%
DMEM- *Dulbelcco's Modified Eagle Medium*
DMSO- dimetil sulfóxido
DNA- ácido desoxirribonucléico
DRI- *dose-reduction index*
DTNB- *5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)* (reagente de Ellman)
EDTA- ácido etileno diamino tetracético
ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática
GR- glutationa redutase
HAART- *highly active antiretroviral treatment*
H&E- hemotoxilina-eosina
HIV- vírus da imunodeficiência humana
i.p.- inoculação intraperitoneal
IC- index de combinação
IFN- γ - interferon gama
IL- interleucina
IPTG- isopropil-D-tiogalactopiranosídeo
IS- índice de seletividade
kDNA- DNA do cinetoplasto (do inglês *kinetoplast*)
LB- meio Luria-Bertani
LIT- *liver infusion tryptose*
LPS- lipopolissacarídeo
MET- microscopia eletrônica de transmissão
MTT- 3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NADPH- *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NK- células *natural killer*
NO- óxido nítrico
OMS- Organização Mundial de Saúde
OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde
pb- pares de bases
PBS- tampão salina fosfato
PCR- reação da polimerase em cadeia

PI- percentual de inibição
qPCR- PCR quantitativa
ROS- espécies reativas de oxigênio
RQ- quantidade relativa
RT- transcrição reversa
RTqPCR- transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SFB- soro fetal bovino
T[S]₂- tripanotiona dissulfeto
T[SH]₂- tripanotiona ditiol
TcTR- tripanotiona redutase recombinante de *T. cruzi*
TDR- Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TNB- *2-nitro-5-mercaptobenzoic acid*
TNF- fator de necrose tumoral
TR- tripanotiona redutase
WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 O uso de compostos naturais.....	4
2.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	5
2.3 Imunopatogênese da doença de Chagas.....	8
2.4 Tratamento etiológico da doença de Chagas.....	10
2.5 Atividade antiparasitária experimental.....	11
2.6 Polifenóis.....	14
2.7 Alvos terapêuticos.....	15
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Fármacos e compostos.....	20
4.2 Parasitos.....	20
4.3 Células.....	22
4.4 Animais.....	23
4.5 Ensaio de atividade antiparasitária <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
4.5.1 Atividade tripanocida <i>ex vivo</i> frente a formas tripomastigotas sanguíneas.....	23
4.5.2 Atividade tripanocida frente a formas amastigotas intracelulares em células Vero e macrófagos murinos.....	23
4.5.3 Avaliação da citotoxicidade.....	24
4.5.4 Dosagem da produção de NO.....	25
4.5.5 Análise de modificações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	25
4.5.6 Avaliação do efeito do tratamento combinado <i>in vitro</i>	26
4.6 Ensaio de inibição <i>in vitro</i> da tripanotiona redutase (TR) e glutationa redutase (GR).....	26
4.6.1 Expressão heteróloga e purificação da TR de <i>T. cruzi</i>	26
4.6.2 Ensaio de inibição da TR heteróloga de <i>T. cruzi</i> (<i>Tc</i> TR)....	28
4.6.3 Ensaio de inibição da GR.....	29
4.7 Ensaio de atividade antiparasitária <i>in vivo</i>	30
4.7.1 Triagem <i>in vivo</i> de compostos ativos (tratamento agudo, <i>clearance</i>).....	30
4.7.2 Avaliação da atividade tripanocida na fase aguda.....	31
4.7.3 Avaliação da atividade tripanocida na fase crônica.....	31
4.8 Exames para o monitoramento da infecção e da eficácia do tratamento.....	32
4.8.1 Exame parasitológico a fresco.....	32

4.8.2 Hemocultura.....	32
4.8.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.8.4 Histopatologia.....	33
4.9 Avaliação do potencial anti-inflamatório na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	33
4.9.1 Infecção e tratamento.....	33
4.9.2 Avaliação do perfil de citocinas transcritas através de RT-qPCR.....	34
4.9.3 Estimativa da carga parasitária no tecido cardíaco por qPCR.....	35
4.10 Análise estatística dos ensaios <i>in vivo</i>	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Atividade tripanocida frente a formas tripomastigotas sanguíneas.....	37
5.2 Atividade tripanocida frente a formas amastigotas intracelulares em células Vero e macrófagos murinos.....	38
5.3 Avaliação do efeito do tratamento combinado <i>in vitro</i>	42
5.4 Análise das alterações ultraestruturais por MET induzidas pelo galato de dodecila em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares.....	44
5.5 Ensaios de inibição <i>in vitro</i> da tripanotiona redutase recombinante de <i>T. cruzi</i> (<i>Tc</i> TR) e glutationa redutase (GR).....	47
5.5.1 Expressão heteróloga e purificação da <i>Tc</i> TR.....	47
5.5.2 Ensaio de inibição da <i>Tc</i> TR e GR.....	47
5.6 Avaliação da atividade tripanocida na fase aguda.....	50
5.6.1 Triagem <i>in vivo</i> de compostos ativos (tratamento agudo, <i>clearance</i>).....	50
5.6.2 Avaliação da atividade tripanocida na fase aguda.....	52
5.7 Avaliação da atividade tripanocida na fase crônica.....	54
5.8 Avaliação do potencial anti-inflamatório na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	61
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÕES.....	79
8. REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas, descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é uma zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 10 a 12 milhões de indivíduos estejam infectados nas Américas, desde o México até a Argentina e que 70 a 80 milhões vivam em áreas de risco de transmissão. Entretanto, como enfermidade enzoótica, a doença apresenta uma difusão mais ampla do que a infecção humana, se estendendo desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile (BRENER, 2000; WHO, 2004; TARLETON et al., 2007; COURA; DIAS, 2009).

A principal forma de transmissão do parasito se dá através de fezes e urina de insetos da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Embora cerca de 80% dos casos de transmissão sejam de origem vetorial, a infecção pode também ocorrer através de transfusão sanguínea (5% a 20%), por via placentária (0,5% a 8%) e esporadicamente, por transplantes de órgãos, por acidentes em laboratório ou por contaminação oral (BRENER, 2000; PRATA, 2001). Em 2005, o Estado de Santa Catarina, indene para a doença de Chagas humana, sofreu um surto agudo desta parasitose, através da contaminação oral por ingestão de caldo de cana (STEINDEL et al., 2005; 2008).

No ano 2000, o Brasil foi considerado livre da transmissão vetorial da doença de Chagas graças a uma longa campanha de combate químico aos triatomíneos domiciliados, iniciada a partir da década de 70 (OPAS, 2000). Entretanto, estima-se que no Brasil ainda existam cerca de 3-6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, das quais, 300.000 estão concentradas no Estado de São Paulo (BRENER, 2000; PRATA, 2001). Conforme inquérito sorológico, as maiores prevalências ocorrem nos Estados do Rio Grande do Sul (8,8%), Minas Gerais (8,8%) e Goiás (7,4%) (RASSI; RASSI JR., 2008). Além disso, o Ministério da Saúde registrou no período de 2001 a 2006, 2.476 casos agudos de doença de Chagas, dos quais 1.603 foram por transmissão vetorial, 16 transfusional, sete transplacentários e 850 casos sem a forma de transmissão identificada (LANNES-VIEIRA et al., 2009). A migração humana também vem contribuindo para a expansão da doença de Chagas para regiões não endêmicas, sendo que milhares de casos já foram registrados nos Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália (COURA; VIÑAS, 2010). A manutenção de casos novos somado ao

desafio lançado ao LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) de desenvolver até o final deste ano uma formulação infantil do fármaco benzonidazol, mostram que a doença de Chagas continua sendo um problema médico-social no Brasil e na maioria dos demais países latino-americanos.

Além da marginalização do paciente chagásico, a doença é uma das principais causas de morte súbita. Devido ao seu curso lento e crônico, às vezes associado a elevados graus de morbidade, geralmente a doença acomete o indivíduo em sua fase mais produtiva, acarretando também em aposentadorias precoces. Uma estimativa feita no Brasil, em 1987, mostrou que a perda de horas de trabalho por absenteísmo de 75.000 trabalhadores chagásicos representou um custo de US\$ 625 milhões por ano. Além disso, os gastos com marcapassos e cirurgia para as megavísceras foram da ordem de US\$ 250 milhões. Esses custos não incluíam as consultas médicas, a assistência e o tratamento de suporte dos pacientes chagásicos crônicos, que atingiam US\$ 1.000 anuais/paciente (OPAS, 2000).

Uma das razões por tão elevado ônus é a falta de medicamentos eficazes. Para o tratamento da doença de Chagas, o único fármaco disponível no Brasil é o benzonidazol (Rochagan®), o qual apresenta baixa ou quase nenhuma eficácia na fase crônica da doença, causa efeitos colaterais significativos e índices de cura inferiores a 10% (URBINA; DOCAMPO, 2003). Devido ao caráter silencioso e crônico da doença, a grande maioria dos pacientes tem o diagnóstico confirmatório somente anos após a infecção, o que inviabiliza o tratamento desta doença com o medicamento atualmente disponível.

Diante disto, a OMS vem incentivando estudos que possam apontar novas alternativas para o tratamento desta e outras zoonoses. Entre os vários fármacos atualmente disponíveis para o tratamento de doenças parasitárias, diversos deles foram extraídos de plantas ou sintetizados a partir de protótipos vegetais. Da mesma forma, inúmeras novas moléculas vêm sendo testadas em ensaios pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) ou mesmo clínicos, surgindo como promessas para os medicamentos do futuro (FRAYHA et al., 1997; URBINA et al., 1998, 2003a,b; TEMPONE et al., 2007).

Embora muitos compostos sejam eficazes e mostrem bons resultados nos ensaios *in vitro*, a grande maioria não atinge a fase dos ensaios *in vivo*. Um dos principais obstáculos é a dificuldade de se obter grandes quantidades do composto ativo, sobretudo quando este precisa ser purificado a partir de extratos naturais. Neste sentido, ter uma

molécula protótipo, que possa ser quimicamente modificada, permite a síntese em grande escala de diversos derivados, proporcionando a continuidade dos ensaios antiparasitários até os estudos *in vivo*, os quais são pré-requisitos essenciais para alcançar a fase clínica.

Neste contexto, o Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB) e o Laboratório de Síntese e Atividade (QMC/CFM) da Universidade Federal de Santa Catarina vêm realizando uma ampla triagem de compostos naturais e sintéticos com potencial antiparasitário. Entre os resultados mais promissores estão aqueles obtidos com alguns derivados do ácido gálico (ALBINO, 2005), os quais mostraram expressiva atividade tripanocida *in vitro* em concentrações não tóxicas para a célula hospedeira. Alguns destes compostos foram mais potentes e eficazes que o benzonidazol (Rochagan[®]), fármaco utilizado clinicamente para o tratamento da doença de Chagas. Estes derivados do ácido gálico são relativamente pequenos e, portanto, facilmente sintetizados e modificados quimicamente, sendo que alguns deles estão disponíveis comercialmente. Os resultados prévios com estes compostos, somado ao fato da necessidade de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas, motivaram a continuidade dos estudos sobre o potencial terapêutico tripanocida destes compostos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O uso de compostos naturais

Desde a antiguidade as plantas vêm sendo utilizadas pelo homem na busca da restauração de sua saúde. O mais antigo registro é o Papiro Egípcio de Ebers, datado de aproximadamente 1.550 a.C., onde estão documentadas a preparação e aplicação de cerca de 700 remédios, incluindo o ópio. Hipócrates, no final do século V a.C., descreveu 300 a 400 espécies vegetais com propriedades medicinais (SCHULTES, 1978; RATES, 2000) e na Bíblia pode-se encontrar cerca de 30 descrições de plantas com poder de cura. Portanto, historicamente esta prática milenar se encontra nas mais diversas culturas e civilizações do mundo (COWAN, 1999).

Com a revolução industrial, os compostos de origem vegetal reafirmaram sua importância, pois passaram a representar uma alternativa viável para a obtenção de moléculas protótipos, passíveis de síntese química e comprovação científica de seus efeitos farmacológicos.

Segundo a OMS, dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais 11% são exclusivamente de origem vegetal. Considerando todos os fármacos antineoplásicos, antiparasitários, antibacterianos e antivirais disponíveis no mercado, aproximadamente 60% são de origem natural (SHU, 1998). Além disso, um significativo número de compostos sintéticos, atualmente em uso, foi obtido a partir de moléculas precursoras naturais (WHO, 1998), as quais apresentam amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como: tranquilizante, analgésica, antiinflamatória, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida, entre outras (RATES, 2000).

Embora a triagem de amostras oriundas de fontes naturais tenha levado à descoberta de muitos fármacos utilizados clinicamente para o tratamento de várias doenças humanas, novos medicamentos precisam ser urgentemente desenvolvidos para combater fibrose cística, mal de Alzheimer, acidente vascular cerebral, AIDS e parasitoses tais como malária, leishmanioses, tripanosomíases, entre outras (RATES, 2000; RENSLO; Mc.KERROW, 2006).

Em 1640, o uso do pó da quina extraída de *Cinchona succirubra* (Rubiaceae) e o posterior desenvolvimento de um antimalárico a partir do quinino, foram um marco na história do uso de um produto natural com finalidades terapêuticas. A literatura relata a investigação da atividade antiparasitária em uma extensa variedade de extratos naturais,

cujas pesquisas levaram ao desenvolvimento de alguns medicamentos antiparasitários como os antimoniais (estibogluconato de sódio), a diamidina (pentamidina) e o nitroheterocíclico (metronidazol) (KAYSER et al., 2003; RENSLO; Mc.KERROW, 2006).

Contudo, a disponibilidade de novos agentes quimioterápicos para o tratamento das doenças infecto-parasitárias ainda é incipiente. Uma revisão da literatura mostra que das 1.556 novas moléculas ativas desenvolvidas entre os anos de 1975 a 2004, somente 21 (cerca de 1%) foram para o tratamento de doenças tropicais, das quais oito para malária, três para tuberculose e somente dez para todo o restante do contingente de doenças negligenciadas (WATKINS, 2003; BOUTAYEB, 2007).

A maioria dos medicamentos antiprotozoários disponíveis vem sendo usada clinicamente há muitos anos pela simples razão de não terem surgido melhores opções. Além disso, vários quimioterápicos atualmente disponíveis são frequentemente tóxicos nas doses terapêuticas e, em muitos casos, levam ao surgimento de parasitos resistentes (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; BRENER, 2000; REDDY et al., 2008). Em virtude das altas taxas de prevalência na população e a baixa eficácia dos medicamentos atualmente disponíveis, a OMS incentiva a pesquisa e o desenvolvimento de novas moléculas ativas destinadas ao tratamento de diversas parasitoses e doenças negligenciadas, como a doença de Chagas.

2.2 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana, descrita por Carlos Chagas em 1909, é uma doença infecciosa, tendo como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, parasito pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esta ordem se caracteriza pela presença de flagelo livre e de uma mitocôndria modificada contendo uma organela rica em DNA extranuclear (kDNA) denominado cinetoplasto (BRENER, 2000).

O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo, envolvendo pelo menos três formas evolutivas distintas em dois hospedeiros diferentes: um invertebrado (triatomíneos) e um vertebrado (mamíferos), incluindo diversos mamíferos silvestres e domésticos, bem como o homem. Durante o hematofagismo dos insetos da subfamília Triatominae, ocorre a ingestão de formas tripomastigotas do parasito presentes na circulação do hospedeiro mamífero. No trato digestivo do

inseto, o parasito assume uma forma epimastigota e, após sucessivas divisões binárias, diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas. Estas formas são eliminadas junto com as fezes e urina do triatomíneo durante um novo repasto sanguíneo e são infectantes para os hospedeiros vertebrados. Estas formas tripomastigotas metacíclicas penetram pelo local da picada ou por qualquer solução de continuidade, invadem diversos tipos celulares e realizam seu ciclo intracelular, sob a forma amastigota. Após um período de três a quatro dias, precedendo o rompimento da célula parasitada, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados ao meio extracelular, podendo migrar para a circulação sanguínea e serem ingeridos pelo inseto vetor ou recomeçar novo ciclo intracelular (BRENER, 2000). Dependendo de características bioquímicas e moleculares, o parasito pode mostrar tropismo preferencial por células cardíacas, digestivas ou musculares (ANDRADE et al., 1999).

Embora cerca de 80% dos casos de transmissão seja de origem vetorial, a infecção pode também veicular através de transfusão sanguínea (5% a 20%), por via placentária (0,5% a 8%) e esporadicamente, por transplantes de órgãos, por acidentes em laboratório ou pela contaminação oral (BRENER, 2000; PRATA, 2001). Registros recentes de surtos de doença de Chagas aguda pela via de contaminação oral têm ocorrido em diferentes Estados brasileiros, assim como em outros países da América do Sul (STEINDEL et al., 2005; 2008, PINTO et al., 2008; BELTRÃO et al., 2009, ALARCÓN DE NOYA et al., 2010).

T. cruzi é um táxon composto por subpopulações de origem clonal, mas geneticamente muito diversificadas. Diferentes cepas ou isolados deste parasito apresentam marcante variabilidade, com diferentes taxas de multiplicação, tropismo tecidual e suscetibilidade ao tratamento quimioterápico (ZINGALES et al., 1999, MACEDO et al., 2002). No final da década de 1970, a caracterização de diferentes cepas de *T. cruzi* através do perfil eletroforético de isoenzimas (zimodemas), revelou diferenças entre os zimodemas de parasitos isolados do ciclo de transmissão doméstico (Z2) e silvestre (Z1/Z3) (MILES et al., 1978, ROMANHA, 1982). O refinamento desta classificação (TIBAYRENC; AYALA, 1987), o uso de sondas para seqüências do RNA ribossomal 24S α e região altamente conservada do gene do mini-exon (SOUTO; ZINGALES, 1993; SOUTO et al., 1996) estabeleceram que o táxon *T. cruzi* foi derivado de duas linhagens filogenéticas ancestrais, as quais divergiram entre 10-40 milhões de anos atrás (BRIONES et al., 1999).

Atualmente os zimodemas Z1 e Z2 são referidos como TcI e TcII, os quais circulam predominantemente nos ciclos silvestre e doméstico, respectivamente. Posteriormente, Brisse e colaboradores (2000), utilizando diversos marcadores moleculares, mostraram que o grupo TcII pode ser subclassificado em 5 grupos, denominados de IIa a IIe. Posteriormente, uma terceira linhagem ancestral (TcIII) também foi caracterizada (DE FREITAS et al., 2006). Recentemente, foi proposta uma revisão da nomenclatura, onde cada subgrupo passou a ser classificado como um grupo independente, referido como DTU (*Discrete Typing Unit*) (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2009). Os grupos TcI e TcIIb correspondem, respectivamente, aos grupos TcI e TcII originalmente recomendados durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas. Propõe-se ainda que os subgrupos TcIIa, TcIIc, TcIId e TcIIe sejam denominados TcIV, TcIII, TcV e TcVI respectivamente (ZINGALES et al., 2009). Esta elevada heterogeneidade contribui para a complexidade biológica, epidemiológica e clínica da doença de Chagas.

A doença de Chagas apresenta um curso clínico de evolução lenta e crônica. Alguns dias após a infecção ocorre a fase inicial aguda, na qual formas tripomastigotas podem ser detectadas pelo exame direto do sangue. As manifestações clínicas são variáveis, compreendendo um quadro febril passageiro e inespecífico, linfadenopatia, esplenomegalia branda e, mais raramente, uma intensa miocardite (cerca de 10% dos casos). A maioria dos casos não tratados evolui para a forma crônica indeterminada, a qual consiste na presença da infecção, comprovada por testes sorológicos e/ou parasitológicos indiretos (hemocultura, xenodiagnóstico) e sem sintomatologia clínica associada. Os pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença possuem baixa morbidade e excelente prognóstico (PRATA, 2001; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Contudo, a infecção pode também evoluir para as formas crônicas graves, as quais causam cerca de 45.000 mortes por ano (PRATA, 2001; WHO, 2002). Estas são caracterizadas pelo comprometimento cardíaco (miocardiopatia chagásica) em 20-30% dos casos, ou digestivo (megaesôfago e magacólon) em aproximadamente 10% dos pacientes. Casos de reativação da doença de Chagas são relatados em indivíduos imunossuprimidos, nos quais ocorre o comprometimento do sistema nervoso central. Desta forma, a tripanosomíase americana é atualmente reconhecida como uma doença oportunista (PRATA, 2001; VAIDIAN et al., 2004).

2.3 Imunopatogênese da doença de Chagas

Basicamente são três os processos patológicos básicos que o parasito induz nos vertebrados: a resposta inflamatória, as lesões celulares e a fibrose. Estes processos podem ocorrer em diversos órgãos e tecidos dos vertebrados, aparecendo com maior frequência e intensidade no coração, tubo digestivo e sistema nervoso.

Nas fases iniciais da primo-infecção, imediatamente após a inoculação, o parasito penetra preferencialmente em fibroblastos e macrófagos, aí permanecendo por 3 a 5 dias, em processo de multiplicação. Ao final deste período, a célula se rompe ou inicia sua degeneração, assim como também ocorre a degeneração de alguns parasitos antes de se completar o ciclo replicativo. Os tripomastigotas resultantes estarão viáveis e irão para a corrente circulatória, logo invadindo células vizinhas, reiniciando o ciclo de multiplicação intracelular. Entrementes, das células recém-rompidas serão lançados no interstício muito restos celulares e parasitos mortos (que não conseguiram se diferenciar), elementos estes que irão desencadear a resposta inflamatória focal inicial. Com a repetição sucessiva do ciclo, geralmente em grande intensidade durante a fase aguda, aumentam progressivamente os focos inflamatórios, sendo maiores as repercussões anatômicas e clínicas no miocárdio e no sistema nervoso. Nos quadros mais graves, estes focos se ampliam e confluem, tomando aspecto difuso. Predominam no processo inflamatório agudo os fenômenos vasculares, exsudativos e necrótico-degenerativos, sendo o exsudato celular formado principalmente por macrófagos e linfócitos (DIAS; MACEDO, 2005; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Com o advento da fase crônica, o parasitismo declina significativamente e surge uma franca desproporção entre o número de parasitos nos tecidos e a resposta inflamatória. Embora o ciclo parasitário tenha continuidade na fase crônica, com repetidas reinvasões celulares, este fenômeno ocorre em uma intensidade muito menor, em razão da repressão que as defesas do hospedeiro passam a exercer sobre o *T. cruzi*. As lesões celulares ocorrem em diferentes intensidades, desde alterações mínimas e reversíveis até necroses extensas e avançado processo fibrótico devidas à ação direta do parasito e/ou a outros mecanismos, como a ação citotóxica de células CD8+ e a ação direta de células CD4+, podendo estas células estarem parasitadas ou não (DIAS; MACEDO, 2005; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Diversos estudos apontam para a participação de diferentes citocinas no controle da replicação do *T. cruzi* e no desencadeamento de

processos inflamatórios. Durante a fase aguda da doença de Chagas ocorre uma síntese sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-12) que são responsáveis por ativar componentes da imunidade inata, como células NK e macrófagos (ORTIZ-ORTIZ et al., 1976; LIEKE et al., 2006). A função protetora das células NK está ligada à produção de IFN- γ e ativação de macrófagos (GAZZINELLI et al., 1992, CARDILLO et al., 1996). Dessa forma, macrófagos ativados por IFN- γ e TNF- α são capazes de destruir os parasitos (GAZZINELLI et al., 1992; SILVA et al., 1998) através de enzimas proteolíticas nos fagolisossomos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente óxido nítrico (NO), pela ação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), responsável por catalisar a conversão da L-arginina e L-citrulina em NO (MURAD, 1994).

Desta forma, a resposta imune gerada contra o *T. cruzi* na fase aguda, com infiltração de células T e macrófagos no coração parece ser essencial para o controle da replicação do parasito, visto que camundongos depletados destes tipos celulares apresentaram parasitismo cardíaco e miocardite exacerbados (TARLETON et al., 1994, TARLETON, 2007). Portanto, a resposta imune gerada contra o parasito na fase aguda, exerce um importante papel na redução da carga parasitária sanguínea e tecidual, permitindo a cronicidade da infecção.

Embora não seja esterilizante esta resposta auxilia a manter um equilíbrio entre parasito e hospedeiro que pode perdurar por toda a vida do paciente (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Entretanto, a inflamação contínua no tecido cardíaco resulta na patologia característica da doença de Chagas, a qual está relacionada com lesões inflamatórias, ativação policlonal de linfócitos T e B e hipergamaglobulinemia (ZHANG; TARLETON, 1996; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Apesar da vasta literatura sobre a resposta imunológica envolvida no controle da infecção e da inflamação, os mecanismos envolvidos na imunomodulação ainda não são totalmente esclarecidos. Alguns estudos mostram uma correlação positiva entre a intensidade da infecção durante a fase aguda da doença com a severidade cardíaca observada na fase crônica (TEIXEIRA et al., 2001). Por outro lado, estudos de Hunter e colaboradores (1997) mostraram que camundongos deficientes na produção da citocina IL-10, apesar de serem capazes de controlar os níveis de parasitemia, apresentaram intensa resposta pró-inflamatória e miocardite e elevadas taxas de mortalidade. Desta forma, a IL-10 parece ser uma citocina envolvida na prevenção do dano tecidual provocado pela superprodução de IFN- γ e IL-12 por células T ativadas,

desempenhando um importante papel imunomodulador na infecção pelo *T. cruzi* (HUNTER et al., 1997; SILVA et al., 1998, ANTÚNEZ; CARDONI, 2000; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

2.4 Tratamento etiológico da doença de Chagas

A tripanosomíase americana, apesar de ser um problema de saúde pública e ter sido descrita há um século, ainda não dispõe de um tratamento satisfatório. Há somente dois fármacos nitro-heterocíclicos, que são o nitrofurano nifurtimox (Lampit[®]), com uso clínico introduzido em 1965, mas com produção interrompida; e o 2-nitroimidazol benzonidazol (Rochagan[®]), introduzido empiricamente em 1971 (CROFT, 1997; URBINA; DOCAMPO, 2003) e utilizado no Brasil.

Estudos sobre a ação do nifurtimox mostraram que, na sua metabolização, são produzidas espécies reativas de oxigênio, as quais são acumuladas pelo *T. cruzi*, ocasionando danos na membrana e no DNA do parasito (MAYA et al., 2007). Embora eficaz na fase aguda, este fármaco não possui atividade na fase crônica e provoca severos efeitos colaterais. Atualmente sua produção foi suspensa, sendo que o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas é o benzonidazol (Rochagan[®]) (URBINA; DOCAMPO, 2003; TARLETON et al., 2007).

O benzonidazol é um derivado imidazólico, que também atua através da formação de radicais livres e/ou principalmente, por metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro é reduzido a amina por nitroredutases relacionadas ao citocromo P450 de *T. cruzi*. Estes metabólitos eletrofílicos, muito mais do que a produção de radicais livres, parecem estar envolvido no efeito tripanocida do benzonidazol através de ligações covalentes com várias macromoléculas (MAYA et al., 2007). Além disso, já foi demonstrado que o benzonidazol pode também inibir a NADH-fumarato redutase (ausente na célula hospedeira), responsável pela conversão de fumarato a succinato, interferindo assim, na cadeia respiratória do *T. cruzi* (TURRENS et al., 1996). Embora efetivo na fase aguda, este medicamento, tal como o nifurtimox, também apresenta baixa eficácia na fase crônica, estágio onde se encontra a maioria dos pacientes chagásicos (URBINA; DOCAMPO, 2003; TARLETON et al., 2007). Além disso, requer longo tratamento oral (30 a 60 dias) e produz efeitos colaterais significativos tais como: cefaléias, tonturas, anorexia, vômitos, dermatites, leucopenia e polineuropatia periférica (BRENER, 2000; URBINA; DOCAMPO, 2003).

A baixa taxa de cura em pacientes chagásicos na fase crônica pode estar associada a características biológicas do parasito, o baixo número de parasitos circulantes, além de outros fatores como a autoimunidade, na qual se observa uma persistente inflamação mesmo na ausência do parasito no tecido (LEON; ENGMAN, 2001). Além disso, a resistência natural do *T. cruzi* aos derivados nitroheterocíclicos também já foi demonstrada (FILARDI; BRENER, 1987; MURTA et al., 1998). Desta forma, o aparecimento de resistência torna imprescindível a busca de novas moléculas ou protótipos para o tratamento da enfermidade (SOEIRO; DE CASTRO, 2009).

2.5 Atividade antiparasitária experimental

É notório que uma das principais fontes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas provém da natureza. O isolamento, a caracterização e a avaliação do potencial farmacológico de compostos naturais fornecem importantes protótipos para a síntese química, cujas modificações estruturais podem, potencialmente, aumentar seus índices terapêuticos (TEMPONE et al., 2007).

Inúmeros estudos de atividade antiparasitária de compostos provenientes de diversas fontes naturais têm sido realizados em diferentes modelos experimentais (KAYSER et al., 2003; PIZZOLATTI et al., 2003; TONA et al., 2004; SALEM; WERBOVETZ, 2005). A atividade antiparasitária, inclusive contra *T. cruzi*, já foi descrita para produtos originados de secreção cutânea de anfíbios, venenos de serpentes e organismos marinhos (revisto por TEMPONE et al., 2007). Entretanto, indubitavelmente, o maior número de moléculas naturais estudadas é proveniente de plantas. Alguns desses compostos têm apresentado expressiva atividade antiparasitária e podem ser considerados como moléculas protótipo para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas.

Diferentes estudos têm mostrado que espécies vegetais da família Rutaceae contêm muitos metabólitos secundários, tais como alcalóides, cumarinas e lignanas, as quais apresentam um largo espectro de atividades biológicas, inclusive uma antiparasitária *in vitro* contra *T. cruzi* (MAFEZOLI et al., 2000).

Trabalhos anteriores do nosso grupo, avaliando o potencial tripanocida *in vitro* de 13 plantas nativas da Floresta Atlântica, observaram que 78,5% das frações apresentaram atividade contra as formas de cultura do parasito, sendo que compostos de *Polygala sabulosa* e *P. paniculata* também causaram expressivas taxas de

mortalidade de tripomastigotas sanguíneos (PIZZOLATTI et al., 2003). Posteriormente, Pizzolatti e colaboradores (2008) mostraram que a 6-metoxi-7-preniloxicumarina, isolada das frações ativas (diclorometano e acetato de etila) de *P. sabulosa*, mostrou atividade *in vitro* contra todas as formas evolutivas do *T. cruzi*.

Recentemente, Tempone e colaboradores (2007), em uma ampla revisão, mostraram que diversos terpenos, sobretudo triterpenos (derivados dos ácidos ursólico e oleanólico), iridóis, alcalóides e, sobretudo, polifenóis apresentam considerável atividade tripanocida *in vitro*.

Embora a literatura apresente uma ampla lista de estudos, envolvendo compostos naturais e sintéticos com promissora atividade tripanocida, o surgimento de um fármaco aprovado em todos os testes clínicos ainda não é uma realidade (SOEIRO et al., 2009). Uma das limitações para avaliar a eficácia de produtos naturais *in vivo* é o fato de estes compostos serem, em geral, metabólitos secundários, normalmente presentes em pequenas quantidades, tornando o processo de isolamento e purificação bastante laborioso. Além disso, frequentemente estes compostos possuem estruturas químicas complexas, ocasionando muitas vezes a perda significativa da atividade biológica após sua purificação (STROHL, 2000).

Face a essa problemática, a maioria dos estudos pré-clínicos (*in vivo*) e clínicos, os quais requerem grande quantidade dos compostos, é realizada com produtos sintéticos, normalmente derivados de uma molécula protótipo obtida da natureza, ou com fármacos já instituídos para o tratamento de outras etiologias.

Soeiro e colaboradores (2009) em uma ampla revisão sobre os avanços na quimioterapia experimental da doença de Chagas destacam alguns compostos com atividade *in vitro* e *in vivo*, entre eles algumas diaminas e furamidinas, especialmente seu análogo contendo um substituinte N-fenil (DB569), assim como alguns derivados de naftoquinonas. Estudos *in vivo* utilizando um alcalóide (canthin-6-one) isolado de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae), uma planta medicinal do Paraguai, mostraram que este composto reduziu a parasitemia e elevou a taxa de sobrevivência de camundongos em fase aguda e, em menor grau, na fase crônica (FERREIRA et al., 2007).

Contudo, os resultados mais promissores descritos para a doença de Chagas experimental vêm sendo obtidos com diversos derivados de triazóis, tais como o posaconazol e o bis-triazol D0870 (MOLINA et al., 2000a,b), o ravuconazol (URBINA et al., 2003a,b), entre

outros. Estes fármacos apresentaram eficácia tripanocida *in vivo*, com taxas de cura parasitológica variando entre 60 a 100%, dependendo da cepa de *T. cruzi* e da fase da infecção murina. Além disso, Benaim e colaboradores (2006) mostraram um efeito sinérgico *in vitro* e *in vivo* entre o posaconazol e a amiodarona, um antiarrítmico normalmente utilizado para o tratamento sintomatológico da cardiopatia chagásica.

A despeito da vasta literatura sobre moléculas naturais e sintéticas com atividade tripanocida *in vitro* e, em menor quantidade, *in vivo*, pouco ou nenhum avanço se fez em relação a ensaios clínicos. O uso dos fármacos azólicos, embora muito promissores nos ensaios pré-clínicos e com relativo sucesso no tratamento de casos isolados ou nos testes em fase I e II, tem se mostrado inviável devido a dificuldade de síntese e custo elevado. Segundo relatos do Dr. Urbina, o requerimento de um tratamento prolongado e, frequentemente associado a tratamento de suporte, poderia custar milhares de dólares nos EUA (CLAYTON, 2010a). O custo hospitalar do tratamento completo com posaconazol de uma paciente chagásica portadora de lúpus erimatoso sistêmico em Barcelona foi estimado em aproximadamente € 8.000 (URBINA, 2009; PINAZO et al., 2010; CLAYTON, 2010a).

Desta forma, continua havendo um urgente apelo pela busca por novas moléculas que reúnam características como: eficácia nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*, baixa toxicidade e menor custo de produção. Recentemente, nosso grupo obteve resultados muito animadores avaliando a atividade antiparasitária *in vitro* de diferentes compostos fenólicos, sobretudo derivados do ácido gálico (ALBINO, 2005). Estes compostos, de origem vegetal, são excelentes protótipos, pois possuem estrutura química simples e de fácil manipulação, viabilizando a obtenção de quantidades razoáveis, imprescindíveis para o tratamento da doença de Chagas experimental. Além disso, os compostos fenólicos são amplamente estudados e apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas como antiviral, antibiótica, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidativa, apoptótica seletiva de células cancerígenas, entre outras (CHUNG et al., 1998; KUBO et al., 2002a,b; TAGURI et al., 2004; SAVI et al., 2005; SHIBATA et al., 2005; CHÁVEZ et al., 2006; KRATZ et al., 2008).

2.6 Polifenóis

Os polifenóis são metabólitos secundários encontrados em uma grande variedade de plantas, como por exemplo, *Camellia sinensis* (Theaceae), *Geranium thunbergii* (Geraniaceae), *Theobroma cacao* (Malvaceae), *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae), entre outras. Os taninos representam uma ampla classe de polifenóis complexos, compreendendo tanto os taninos hidrolisáveis como os taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis possuem como núcleo central um carboidrato, ligado a grupos hidroxilas esterificados com os elagitaninos, cuja hidrólise produz o ácido hexahidroxidifenólico, e com os galotaninos, cuja hidrólise produz o ácido gálico (ZHU et al., 1997; CHUNG et al., 1998; OW; STUPANS, 2003).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) e seus derivados, como os ésteres *n*-alquil, são abundantemente encontrados em frutas e plantas, sendo um dos principais componentes fenólicos presentes nos chás preto e verde. Os ésteres do ácido gálico são amplamente utilizados como antioxidantes em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica. Além disso, o ácido gálico é empregado como fonte para o desenvolvimento de corantes e tintas (OW; STUPANS, 2003). Diversos estudos mostram que estes compostos possuem também propriedades farmacológicas, tais como anticancerígena (LIN; LIANG, 2000), antimutagênica (CHEN; CHUNG, 2000), antifúngica (STRIPPOLI et al., 2000; KUBO et al., 2001; FUJITA; KUBO, 2002), antibacteriana (KUBO et al. 2004), antiviral (CHÁVEZ et al., 2006; KRATZ et al., 2008) e anti-inflamatória (LEE et al., 2007), entre outras.

Embora a literatura não seja tão vasta em relação ao uso dos galatos em modelos animais, há um considerável interesse nos seus efeitos *in vivo*, uma vez que estes compostos são amplamente comercializados e, inclusive incorporados em alimentos. Hsu e Yen (2007) ao avaliarem o efeito do uso oral do ácido gálico em um modelo murino de obesidade induzida, observaram a diminuição do peso e da esteatose hepática, a melhora nos parâmetros séricos (colesterol total, LDL, insulina e leptina) e a diminuição do estresse oxidativo. Em uma compilação da literatura, Yin-Yin Ow e Ieva Stupans discutiram o efeito *in vitro* e *in vivo* do ácido gálico e seus derivados sobre as enzimas metabolizadoras de drogas. Nessa revisão, os autores mostraram que os ésteres de galato, quando ingeridos, são hidrolisados a ácido gálico e metabolizados no fígado, onde podem inibir as enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450) (OW; STUPANS, 2003).

Embora diferentes trabalhos já tenham evidenciado o potencial antiparasitário de diversos polifenóis naturais ou modificados, estudos relacionados ao ácido gálico e seus derivados ainda são incipientes e limitados a estudos *in vitro*. Koide e colaboradores (1998) observaram atividade *in vitro* do ácido gálico e de alguns de seus derivados contra *Trypanosoma brucei brucei*. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa sugeriu que o ácido gálico atua como um pró-oxidante e que a formação dos intermediários reativos de oxigênio pode estar envolvida no mecanismo de ação deste composto sobre *T. brucei brucei* (NOSE et al., 1998). Kiderlen e colaboradores (2001), ao avaliarem a atividade leishmanicida de 28 polifenóis, verificaram que 25 deles foram ativos contra formas intracelulares de *Leishmania donovani*.

Albino (2005) avaliou a atividade tipanosomicida *in vitro* de 28 compostos derivados do ácido gálico e observou que quatro ésteres de galato (galatos de decila, undecila, dodecila e tetradecila) foram ativos contra epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi*, cujas CI_{50} foram semelhantes ou menores que a do benzonidazol. Efeitos de citotoxicidade celular *in vitro* foram observados somente em concentrações superiores aos valores de CI_{50} . Estes resultados, em conjunto com àqueles descritos na literatura, sugerem que os ésteres de galato podem ser compostos promissores para a quimioterapia ou quimioprofilaxia da doença de Chagas e que seu potencial quimioterapêutico precisa ser também investigado em modelos experimentais *in vivo*.

2.7 Alvos terapêuticos

Tradicionalmente, o estudo de compostos com atividade antiparasitária envolve testes aleatórios com substâncias naturais ou sintéticas, sendo que a maioria dos fármacos instituídos foi desenvolvida empiricamente.

Desta forma, o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas depende da identificação das diferenças do metabolismo humano e do parasito (DOCAMPO, 2001). Os avanços dos conhecimentos bioquímicos, moleculares, fisiológicos e o entendimento do ciclo de vida dos parasitos no homem permitem que, atualmente, o planejamento de fármacos possa ser feito de maneira racional, com ênfase no mecanismo de ação, atingindo alvos específicos e essenciais dos parasitos (FRAYHA et al., 1997; WANG, 1997; DOCAMPO, 2001; SOEIRO; DE CASTRO, 2009). Além disso, a descrição completa do genoma de *T. cruzi* revelou centenas de genes novos, cujos

potenciais alvos terapêuticos vêm sendo identificados e reunidos em um banco de dados organizado pelo Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais, TDR (www.tdrtargets.org).

Neste contexto, a tripanotiona redutase (TR, EC 1.8.1.12) é uma das enzimas que tem despertado grande interesse e já é reconhecida como um alvo validado para o desenho racional de fármacos para o tratamento da doença de Chagas e leishmanioses (WANG, 1997; SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002; CHIBALE; MUSONDA, 2003). Esta enzima, descrita em 1985, ocorre exclusivamente em tripanosomatídeos e desempenha um importante papel na defesa antioxidante destes parasitos (FAIRLAMB et al., 1985). A TR é uma oxirredutase dependente de NADPH e catalisa a redução da tripanotiona dissulfeto $[T(S)_2]$ em tripanotiona ditiol $[T(SH)_2]$, desencadeando assim, uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio (Figura 1). Desta forma, a TR mantém um ambiente redutor no interior do parasito, protegendo-o do estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2008). A função fundamental exercida pela TR no parasito, assim como a sua significativa diferença estrutural em relação à glutationa redutase (GR, EC 1.8.1.7), enzima com função correspondente no homem, fazem com que a TR seja um alvo interessante para o planejamento de fármacos antiparasitários (WANG, 1997; RODRIGUEZ, 2001; OLIVEIRA et al., 2008). As principais diferenças entre a TR e a GR estão relacionadas ao tamanho, carga e distribuição de bolsões hidrofílicos/hidrofóbicos, permitindo que a TR seja capaz de acomodar mais facilmente substratos mais volumosos do que a GR (GIRAULT et al., 2001). Além disso, enquanto que a TR apresenta resíduos carregados negativamente e regiões hidrofóbicas em seu sítio ativo, a GR apresenta resíduos de arginina, carregados positivamente (Figura 2) (OLIVEIRA et al., 2008). Em função da biossíntese da tripanotiona ocorrer a partir de dois passos consecutivos, nos quais a glutationa é ligada covalentemente ao grupo amino terminal da espermidina (Figura 1), a via metabólica das poliaminas também tem sido apontada como um possível alvo terapêutico (MÜLLER et al., 2001).

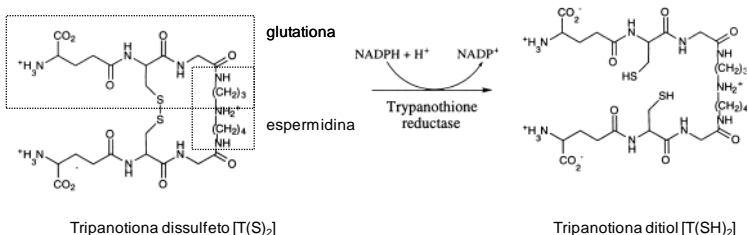


Figura 1. Reação catalisada pela tripanotiona redutase (Fonte: Bonnet et al., 2000; Girault et al., 2001, com modificações).

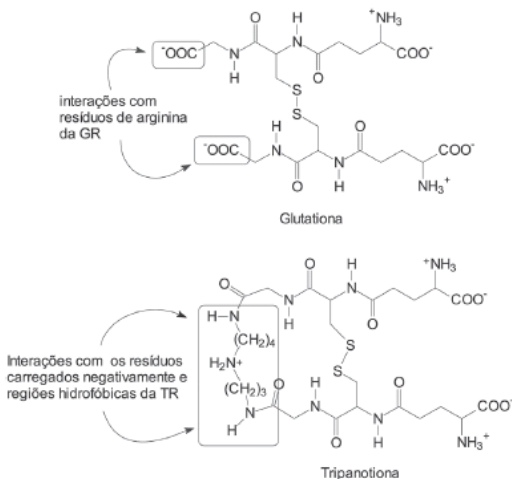


Figura 2. Comparação entre as estruturas da glutationa e tripanotiona, substratos da GR e TR, respectivamente (Fonte: Oliveira et al., 2008).

Além da TR, outros alvos específicos como a cisteína proteinase (= cruzipaina ou cruzaina), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, as DNA topoisomerases, a diidrofolato redutase entre outros também têm sido investigados para a pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos ativos contra os tripanosomatídeos (DOCAMPO, 2001; RODRIGUEZ, 2001).

A partir dos estudos da equipe do Dr. Júlio A. Urbina, a via de biossíntese de esteróis dos tripanossomatídeos passou a ser um dos alvos em potencial para o desenvolvimento de compostos efetivos contra a doença de Chagas e leishmanioses (DOCAMPO, SCHMUÑIS, 1997). A sobrevivência e a proliferação destes protozoários dependem de esteróis endógenos específicos, como o ergosterol e análogos. Enquanto os tripanossomatídeos utilizam a via anabólica do ergosterol para a biossíntese de membranas celulares, os mamíferos utilizam o colesterol como precursor (URBINA, 1997; 2009). Sendo assim, compostos inibidores da biossíntese do ergosterol são de grande importância para o desenvolvimento de compostos com atividade tripanocida (URBINA, 2009).

Alguns antifúngicos triazólicos, inibidores da biossíntese do ergosterol, têm demonstrado uma promissora atividade, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* em modelos murinos (URBINA et al., 1998, 2003a,b; KAYSER et al., 2003), sendo que alguns destes derivados triazólicos interferiram no metabolismo de esteróis do parasito (LIENDO et al., 1998; URBINA et al., 1998).

Abe e colaboradores (2000) ao avaliarem o efeito inibitório de alguns ésteres de galato sobre a esqualeno epoxidase recombinante, enzima envolvida na via metabólica de esteróis, observaram uma potente e seletiva inibição enzimática, principalmente do galato de doceçila ($CI_{50} = 0,061 \mu M$). Embora o mecanismo de ação dos galatos sobre o crescimento de *T. cruzi* ainda não tenha sido elucidado, a baixa toxicidade para células de mamíferos em concentrações ativas, sugere um mecanismo de ação específico.

Considerando: a) a necessidade de novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas; b) os resultados promissores apresentados por alguns galatos em ensaios *in vitro*; c) a facilidade de obter diversos derivados, cujas modificações estruturais podem elevar a eficácia antiparasitária com redução de toxicidade e efeitos colaterais, este estudo torna-se relevante e factível. Neste sentido, o presente estudo teve como propósito avaliar o efeito tripanocida *in vitro* e *in vivo* de ésteres do ácido gálico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial tripanocida *in vitro* e *in vivo* do ácido gálico e derivados.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o potencial quimioprolifático do ácido gálico e ésteres de galato contra formas tripomastigotas sanguíneos;

- Avaliar a atividade tripanocida contra amastigotas em células Vero e macrófagos murinos derivados de medula óssea;

- Analisar as mudanças ultraestruturais causadas pelo galato de dodecila em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares;

- Investigar o efeito inibitório do ácido gálico e ésteres de galato sobre a tripanotiona redutase recombinante de *T. cruzi*;

- Avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* do tratamento combinado do galato de dodecila com benzonidazol;

- Avaliar a atividade tripanocida dos galatos em camundongos infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda e crônica;

- Investigar a participação do galato de dodecila na diminuição da inflamação no modelo murino de infecção crônica da cepa Colombiana de *T. cruzi*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos e fármacos

Neste estudo foram testados o ácido gálico e cinco derivados: ésteres de octila, decila undecila, dodecila e tetradecila (Figura 3). Todos os compostos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis), sendo que os galatos de decila, undecila e tetradecila foram adquiridos como alcoóis e posteriormente esterificados pelo Laboratório de Síntese e Atividade do Departamento de Química da UFSC. Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a -20°C por um período máximo de três semanas. Como controles de atividade tripanocida, foram utilizados o benzonidazol e a violeta de genciana (Sigma-Aldrich, Saint Louis) (Figura 3). O imunossupressor ciclofosfamida (Genuxal®) foi obtido da Baxter Healthcar (Deerfield, Illinois). Para os ensaios de inibição enzimática foram utilizados como controle a clomipramina (Sigma-Aldrich, Saint Louis) e a carmustina (Becenun® - BCNU, Bristol-Myers Squibb, New York) (Figura 4).

4.2 Parasitos

Os compostos foram avaliados frente à cepa Y (SILVA; NUSSENWEIG, 1953) e, adicionalmente em alguns ensaios, à cepa Colombiana (FEDERICI et al., 1964) de *T. cruzi*, as quais apresentam, respectivamente, média sensibilidade e resistência *in vivo* aos nitroimidazóis (FILARDI; BRENER, 1987). Estas cepas estão criopreservadas no Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC). Os parasitos foram mantidos, através de repiques semanais, em camundongos Swiss ou BALB/c (para os ensaios *in vivo* e *ex vivo* com tripomastigotas sanguíneos), em cultura axênica em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino – Gibco, New York) (para os ensaios *in vitro* com epimastigotas) e em células Vero cultivadas em meio DMEM + 5% SFB (para os ensaios *in vitro* com amastigotas e tripomastigotas).

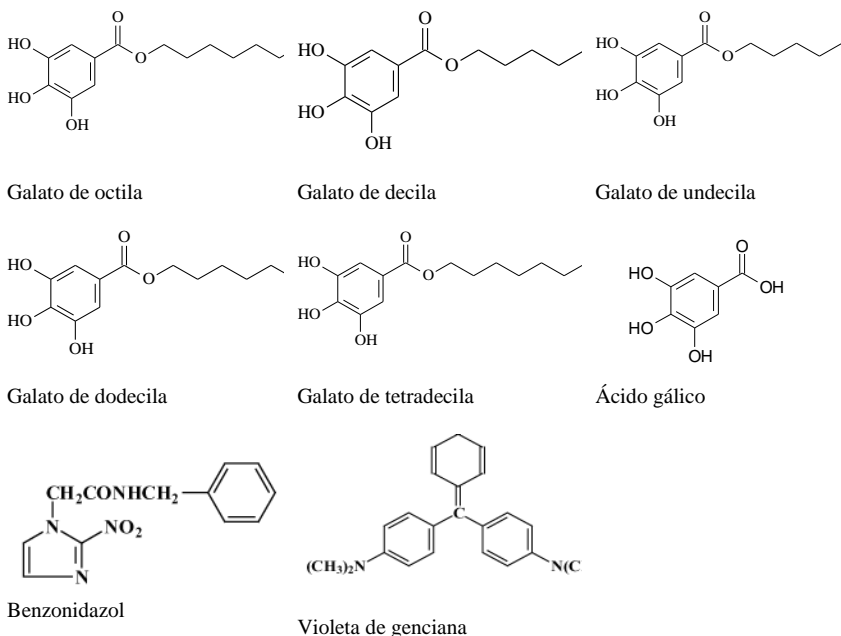


Figura 3. Estruturas químicas dos compostos testados (ácido gálico e seus ésteres) e dos controles de atividade tripanocida, benzonidazol e violeta de genciana.

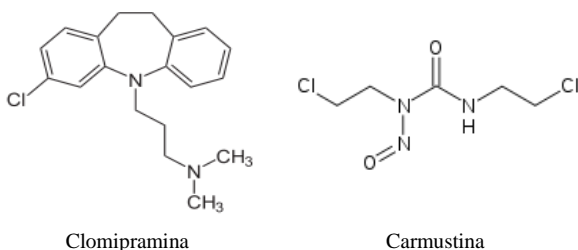


Figura 4. Estruturas químicas da clomipramina e da carmustina (Becenun® - BCNU), inibidores das enzimas tripanotona redutase e glutatona redutase, respectivamente.

4.3 Células

Para os ensaios de atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares e citotoxicidade foram utilizadas células não fagocíticas profissionais (linhagem Vero – ATCC CCL-81) e fagocíticas (macrófagos murinos derivados de medula óssea).

As células da linhagem Vero foram mantidas a 37°C em estufa umidificada de CO₂ em garrafas de cultura de 25 cm² em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich, Saint Louis) pH 7,4 + 2,5% de SFB acrescido de 2 mM de L-glutamina, 10 µg/ml de estreptomicina e 10 UI/ml de penicilina (Cultilab, Campinas). Para os bioensaios, as monocamadas foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) pH 7,4 e tratadas com tripsina 0,25% (Sigma-Aldrich, Saint Louis) + EDTA 0,1% (Serva, Heidelberg) por 5 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em DMEM pH 7,4 + 2,5% de SFB, a 250 x g/5 minutos a 4°C e suspensas no mesmo meio. A viabilidade celular foi verificada pelo corante vital Azul de tripano, a concentração ajustada para 10⁶ células/ml, semeadas em placas de 96 poços (2x10⁴ células/poço) em meio DMEM + 2,5% SFB e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram utilizadas para os bioensaios de citotoxicidade e atividade antiparasitária.

Para a obtenção dos macrófagos, camundongos da linhagem BALB/c foram sacrificados e a medula óssea foi obtida por aspiração do fêmur e da tíbia. Para a criopreservação, as células foram centrifugadas a 1.000 x g por 5 minutos a 4°C em PBS (pH 7,4) e suspensas em SFB e 10% de DMSO. Em seguida, as células foram armazenadas a -80°C e, após 18 horas, foram depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia até o uso.

Para os ensaios com os macrófagos, as células da medula óssea foram descongeladas, semeadas em placas de seis poços e cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com SFB 10%, 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml estreptomicina e 30% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1). Após sete dias, os macrófagos diferenciados foram tripsinizados, centrifugados a 1.000 x g por 5 minutos, suspensos em meio DMEM + SFB 10% e cultivados em placas de 96 poços (10⁵ células/poço) nas mesmas condições. Após 24 horas, os macrófagos foram utilizados para os bioensaios de citotoxicidade e atividade antiparasitária.

4.4 Animais

Os ensaios de atividade tripanocida *in vivo* e a obtenção de macrófagos foram realizados com camundongos Swiss e BALB/c, respectivamente, fornecidos pelo Biotério Central da Univali. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (CCB/UFSC) em ambiente a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em um ciclo de luz e escuridão de 12:12h e tratados com ração e água “*ad libitum*”. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Univali (parecer nº 440/2005).

4.5 Ensaios de atividade antiparasitária *ex vivo* e *in vitro*

4.5.1 Atividade tripanocida *ex vivo* frente a formas tripomastigotas sanguíneas

As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos Swiss primoinfectados com a cepa Y, no sétimo dia da infecção. Os animais foram anestesiados com éter e sangrados pelo plexo retroorbital com auxílio de pipeta Pasteur contendo citrato de sódio 3,8% como anticoagulante. O sangue de três animais foi coletado em tubo contendo um ml da solução anticoagulante. O número de parasitos foi determinado pelo método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962), o qual consiste na contagem microscópica dos tripomastigotas em 50 campos por lamínula (22 x 22 mm) em cinco mm^3 de sangue. O sangue contendo os tripomastigotas foi lavado em PBS a 2.000 x g por 10 minutos e a concentração ajustada para 10^6 tripomastigotas/ml pela adição de meio LIT + 10% SFB.

Os ensaios foram realizados em microplacas de culturas de 96 poços, contendo concentrações de 200 e 50 μM dos compostos, em um volume final de 150 μl contendo 10^6 tripomastigotas/ml. Como controles, foram utilizados 1% de DMSO e violeta de genciana nas mesmas concentrações dos galatos. As placas foram mantidas a 4°C por 48 horas e o número de parasitos sobreviventes determinado pelo método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962). Os ensaios foram realizados em duplicata contendo três réplicas por ensaio.

4.5.2 Atividade tripanocida frente a formas amastigotas intracelulares em células Vero e macrófagos murinos

Células Vero e macrófagos previamente semeados em placas de 96 poços foram infectados com tripomastigotas das cepas Y ou

Colombiana provenientes de cultivo celular, na proporção de dez parasitos por célula Vero e dois por macrófago. Após quatro horas, as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não interiorizados e mantidas por 12 horas em 180 µl/poço de DMEM + SFB 10% a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos, em um volume final de 200 µl/poço, nas mesmas condições por 48 horas. Como controles, foram utilizados o benzonidazol e o solubilizante DMSO a 1%. Para se certificar de que a diminuição do número de células infectadas não tenha ocorrido pela lise da célula hospedeira, decorrente do ciclo de multiplicação intracelular, as monocamadas foram observadas em microscópio invertido Olympus para verificar a presença de tripomastigotas no sobrenadante. As placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa (Merck, Darmstadt).

A avaliação da atividade tripanocida foi realizada pela contagem aleatória de 1.000 células por poço em microscópio invertido Olympus, objetiva 40x, observando-se o número de células infectadas, o número de amastigotas/célula e o número total de amastigotas/poço.

Os valores foram expressos como percentual de inibição (PI), o qual foi calculado segundo Guru e colaboradores (1989) e modificado por Lakshmi e colaboradores (2007), utilizando a seguinte fórmula:

$$PI = 100 - (T/C \times 100), \text{ onde}$$

T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas;

C é a média do total de amastigotas intracelulares em células do controle DMSO 1%.

Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória de 50%) foram estimados a partir dos valores de PI obtidos em três réplicas em duplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat 3®.

4.5.3 Avaliação da citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, células Vero e macrófagos foram incubados com diferentes concentrações (20 a 500 µM) dos compostos em placas de 96 poços por 72 horas, nas mesmas condições descritas acima. A integridade do tapete celular foi observada em microscópio invertido Olympus, seguida do ensaio colorimétrico do MTT ([3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio], Amresco, Ohio), conforme descrito por Loosdrecht e colaboradores (1991) e modificado por Sieuwerts e colaboradores (1995).

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória a 50%) foram estimados a partir dos valores médios obtidos de três réplicas em duplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat 3®. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Em todos os ensaios foram utilizados o benzonidazol e o solubilizante DMSO 1% como controles. Além disso, no final dos experimentos com os macrófagos foram recolhidos 150 μ l do sobrenadante para a dosagem indireta da produção de óxido nítrico (NO). Como controle positivo da ativação da via de NO, foi utilizado 10 μ g de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, Saint Louis).

4.5.4 Dosagem da produção de NO

A concentração de nitrito (NO_2^-) liberado pelos macrófagos e determinado pela reação de Griess foi utilizado como um indicador da produção de NO. Brevemente, após 48 horas de incubação com os compostos, o sobrenadante das culturas de células infectadas e não infectadas foi misturado com igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de α -naftil-etilenodiamina em água Milli-Q). As densidades ópticas (D.O.) foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm, conforme descrito por Ding e colaboradores (1988). A concentração de NO_2^- foi determinada por uma curva padrão de $NaNO_2$ e expressa como nmol/ml.

4.5.5 Análise de modificações ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar as modificações ultraestruturais induzidas pelo tratamento com os compostos, formas epimastigotas e amastigotas interiorizadas em células Vero foram tratados respectivamente com 50 e dois μ M de galato de dodecila por 48 horas e processadas para MET conforme descrito por Meirelles e Soares (2001). Resumidamente, as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 ml e centrifugadas 30 a 60 segundos a 10.000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram fixados por 20 a 30 minutos com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, as células foram lavadas por centrifugação a 10.000 x g/30 a 60 segundos com tampão fosfato e em seguida com tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Logo após, foi feita a fixação por 15 minutos em ósmio diluído a 1% em tampão

cacodilato 0,1 M (contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e cinco mM de CaCl_2 , concentração final), seguido de duas lavagens no mesmo tampão, sem ósmio. As desidratações foram feitas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), três minutos em cada. Em seguida, os sedimentos foram infiltrados por duas a 18 horas em solução Epon/acetona (1:1), quatro horas em Epon puro e então embebidos em nova solução de Epon puro para a polimerização da resina durante 48 a 72 horas a 60°C. Os cortes ultrafinos foram contrastados por 30 minutos em acetato de uranila aquoso 2% e por dois minutos no citrato de chumbo.

As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-2100-TEM, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC) com a colaboração do Dr. Maurílio José Soares do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba (PR).

4.5.6 Avaliação do efeito do tratamento combinado *in vitro*

O efeito tripanocida do tratamento combinado do benzonidazol e do galato de dodecila sobre formas amastigotas intracelulares foi avaliado. Para tanto, células Vero foram infectadas com tripomastigotas de cultura, conforme descrito no item 4.5.2 e incubadas por 48 horas com diferentes concentrações de galato de dodecila, de benzonidazol e com a combinação de ambos na proporção de 1:10 (galato de dodecila:benzonidazol). Esta proporção e as respectivas concentrações foram escolhidas de acordo com o percentual de inibição previamente estabelecido para cada um dos compostos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os valores de DRI (do inglês *Dose-Reduction Index*) e o Index de Combinação (IC) foram determinados através do programa CompuSyn®, onde $\text{IC} = 1$, < 1 e > 1 indicam efeitos aditivo, sinérgico e antagonico, respectivamente (CHOU; TALALAY, 1984; CHOU, 2008).

4.6 Ensaios de inibição *in vitro* da tripanotiona redutase (TR) e glutaciona redutase (GR)

4.6.1 Expressão heteróloga e purificação da TR de *T. cruzi*

Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração da Dra. Patrícia Hermes Stoco no Laboratório de Protozoologia, o qual é certificado pela CTNBio para pesquisa com organismos modificados geneticamente (CQB 101/99, Comunicado CTNBio nº 134). Para a

expressão heteróloga, formas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram submetidas ao protocolo padrão de extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio segundo Sambrook e colaboradores (2001). O gene completo da TR foi amplificado via PCR, utilizando iniciadores desenhados com base na sequência disponível no GenBank (acesso XM_800203.1) contendo sítios (sequências sublinhadas) para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* TcTR-F (5'GTCACCATATGTTTGGATTGGTTGTCATTGGCG 3') e TcTR-R (5'GGATCCTTACAGAGATGCTTCTGAAGGCTT3'). O produto de PCR (1.480 pb) e o plasmídeo pET14B (Novagen, Darmstadt) foram digeridos com *NdeI* e *BamHI*, utilizando 60 unidades de cada enzima em tampão apropriado a 37°C por três horas. Os produtos digeridos foram resolvidos em gel de agarose 1%, e os fragmentos de DNA purificados com o sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit® (GE Healthcare, Buckinghamshire). Estes fragmentos foram então ligados e após 16 horas a 16°C as reações de ligação foram utilizadas para transformar *E. coli* BL21 DE3 (pET14B) a partir de eletroporação a 2,5 KV em aparelho MicroPulser® (BioRad, Richmond). Após uma hora de crescimento em 1 ml de meio SOC as bactérias foram semeadas em placas LB ágar (100 µg/ml ampicilina) e mantidas a 37°C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita a partir de PCR diretamente das colônias. Um clone positivo foi selecionado e purificado por lise alcalina para confirmação da orientação do inserto através de sequenciamento.

Para a expressão heteróloga, a colônia selecionada foi utilizada em um pré-inóculo contendo 10 ml de meio LB (100 µg/ml de ampicilina), mantido a 37°C por 16 horas sob agitação. Uma diluição de 1:10 em 30 ml do mesmo meio foi mantida sob agitação constante a 37°C até atingir uma D.O. de 0,6. Neste momento, foi adicionado isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM, prosseguindo-se por 4 horas a 37°C sob agitação.

Em seguida, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em 100 mM NaH₂PO₄. A purificação da proteína heteróloga foi realizada a partir de cromatografia de afinidade contra a cauda de histidinas presente na proteína recombinante. Para tanto, o sedimento bacteriano foi lisado através da adição de 2 ml de tampão de lise em condições nativas (300 mM NaCl; 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazol, pH 8,0) e sonicação em 10 ciclos de 30 segundos a 40 Hz com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. O material lisado foi centrifugado a 4°C por 30 minutos a

12.000 x g e o sobrenadante imobilizado em 400 µl do suporte Ni-NTA agarose (Qiagen, Duesseldorf), conforme instruções do fabricante. O suporte foi lavado duas vezes com 2 ml do tampão de lavagem (300 mM NaCl; 100 mM NaH₂PO₄, 20 mM imidazol, pH 8,0) e a proteína liberada em quatro etapas de adição de 200 µl do tampão de eluição (300 mM NaCl; 100 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazol, pH 8,0). Para a retirada do imidazol, as eluições foram dialisadas a 4°C por duas vezes contra o tampão da enzima (40 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,5).

Os extratos protéicos bacterianos, assim como as proteínas purificadas e as etapas de purificação foram dosados pelo método de Bradford (1976) e avaliados por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10%, esperando-se uma proteína de 55,5 kDa. Um dos géis foi corado com azul de Coomassie R250 e um segundo gel foi submetido a transferência para membranas de nitrocelulose Hybond-ECL® (GE Healthcare, Buckinghamshire) durante 12 horas a 25 V, conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). Para revelação do *western blot*, foi utilizado o anticorpo anti-HisTag 1:5.000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis), seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em uma diluição de 1:10.000. A membrana foi lavada e revelada através da utilização do reagente ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire) em filme radiográfico utilizando o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China).

Para verificar a atividade da enzima bem como a melhor concentração para os subsequentes ensaios de inibição, diferentes concentrações da enzima purificada foram utilizadas, conforme protocolo descrito abaixo.

4.6.2 Ensaio de inibição da TR heteróloga de *T. cruzi* (*TcTR*)

Os ensaios de inibição da *TcTR* foram realizados segundo o método descrito por Hamilton e colaboradores (2003) que consiste em um teste colorimétrico em microplaca baseado na derivatização da tripanotona. Basicamente, a *TcTR* reduz o substrato tripanotona (T[S]₂ → T[SH]₂) e o DTNB (reagente de Ellman) regenera a tripanotona reduzida (T[SH]₂ → T[S]₂), liberando TNB, o qual gera um cromóforo amarelo que é mensurado a 412 nm (Figura 5). Desta forma, o reagente de Ellman mantém constante a concentração do substrato e permite a linearidade da cinética enzimática. Haja vista que uma das principais limitações é o elevado custo do substrato, a regeneração da tripanotona pelo DTNB viabiliza economicamente o ensaio.

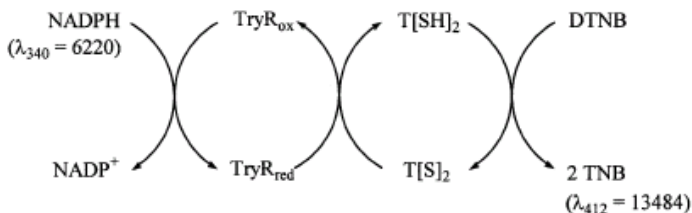


Figura 5. Mecanismo esquemático da re-oxidação de tripanotona reduzida (T[S]₂) mediada pelo DTNB (Fonte: Hamilton et al., 2003).

O ensaio enzimático foi conduzido em placas de 96 poços em um volume final de 250 µl contendo: 40 mM de Hepes (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 150 µM de NADPH, 1 µM de tripanotona (Bachem, Torrance), 25 µM de DTNB (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 230 ng da enzima (*TcTR*) e diferentes concentrações (12,5 a 100 µM) dos compostos testados em uma concentração máxima de 1% de DMSO. Como controles, foram utilizados o inibidor clomipramina (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em diferentes concentrações e o solubilizante DMSO 1%. Como branco, foram utilizados os compostos na maior concentração (100 µM) incubados com todos os reagentes, menos a enzima. A mistura foi pré-incubada a 30°C durante 30 minutos e a leitura iniciada após a adição de 25 µM de DTNB em λ₄₁₂ nm, medindo-se a inclinação da curva durante 30 minutos (δAbs/δt). Este valor foi comparado com o controle DMSO 1% para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes e os resultados expressos como o percentual de redução na atividade enzimática comparado ao controle DMSO 1%. Na triagem, foram considerados ativos os compostos que inibiram pelo menos 50% da atividade enzimática.

4.6.3 Ensaio de inibição da GR

Os testes de inibição da GR de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foram realizados de acordo com o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985) e que mede a absorbância do NADPH em λ₃₄₀ nm. A atividade enzimática é representada pela diminuição da absorbância a medida que o NADPH vai sendo

consumido na reação, resultando em um coeficiente de correlação negativo.

O ensaio colorimétrico foi realizado em placas de 96 poços em um volume final de 250 µl contendo: 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 1 mM de EDTA, 400 µM de NADPH, 1 mM de glutatona oxidada (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 10 mU da enzima (GR – Sigma-Aldrich, Saint Louis) e diferentes concentrações (12,5 a 100 µM) dos compostos testados em uma concentração máxima de 1% de DMSO. Controles com 10 µM do inibidor Becenun® carmustina - BCNU (Bristol-Myers Squibb, New York) e sem amostra foram realizados em paralelo. A mistura foi pré-incubada a 30°C durante 30 minutos e a leitura iniciada após a adição de 1 mM de substrato (glutatona oxidada) em λ_{340} nm, medindo-se a inclinação da curva durante cinco minutos ($\delta\text{Abs}/\delta t$). Este valor foi comparado com o controle sem amostra para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes. Foram considerados ativos os compostos que inibiram pelo menos 50% da atividade enzimática.

4.7 Ensaios de atividade antiparasitária *in vivo*

4.7.1 Triagem *in vivo* de compostos ativos (tratamento agudo, *clearance*)

Inicialmente os compostos tiveram sua atividade tripanocida *in vivo* avaliada segundo o método descrito por Filardi e Brener (1984). Grupos de cinco camundongos Swiss, fêmeas, com seis semanas de idade, pesando entre 25 a 30 g, foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y por animal. Sete dias após, foi administrado via oral (gavagem) uma dose elevada (500 mg/Kg) em um volume de 200 µl/animal de cada um dos compostos. A parasitemia dos camundongos foi avaliada antes, 6 e 24 horas após o tratamento. A mortalidade foi acompanhada diariamente por 30 dias. Como controle, foi utilizado a mesma dose de benzonidazol e o veículo (DMSO 10% + trigliceril CM® Support Produtos Nutricionais Ltda, São Paulo). A atividade tripanocida foi definida através da redução significativa da parasitemia e da mortalidade em dois experimentos independentes.

4.7.2 Avaliação da atividade tripanocida na fase aguda

Grupos de cinco camundongos Swiss, fêmeas, com seis semanas de idade, pesando entre 25 a 30 g, foram inoculados via i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y por animal e o tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção. A administração dos compostos, inclusive do benzonidazol, foi feita pela via oral (gavagem), durante sete dias consecutivos na dose de 50 mg/kg/dia em um volume de 100 µl/animal. A atividade tripanocida foi avaliada através da redução significativa da parasitemia e da mortalidade até um período de 30 dias após o tratamento, em dois experimentos independentes.

4.7.3 Avaliação da atividade tripanocida na fase crônica

Grupos de 10 a 15 camundongos foram inoculados via i.p. com 50 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y por animal. Após sete dias, a infecção foi confirmada pelo exame a fresco, seguido de um tratamento agudo (uma dose de 100 mg/kg) de benzonidazol pela via oral. Esta dose é capaz de reduzir a parasitemia e prevenir a mortalidade, permitindo o desenvolvimento de uma infecção crônica e latente. Semanalmente, os camundongos foram submetidos ao exame a fresco até o desenvolvimento de parasitemias subpatentes, caracterizando o início da fase crônica (cerca de 30 a 45 dias após a infecção).

Sessenta dias após a infecção, os animais foram separados em grupos de 10 a 15 animais e tratados uma vez ao dia pela via oral (gavagem) durante 28 dias consecutivos com (1) ácido gálico 50 mg/kg/dia; (2) galato de dodecila 50 mg/kg/dia; (3) tratamento combinado de galato de dodecila (50 mg/kg/dia) + benzonidazol (5 mg/kg/dia), (4) benzonidazol 5 mg/kg/dia; (5) benzonidazol 100 mg/kg/dia e (6) veículo (DMSO 2,5% + trigliceril). Semanalmente, os animais foram avaliados pelo exame a fresco durante e até 30 dias após o término do tratamento.

Adicionalmente, cinco dias após o término do tratamento, cinco animais de cada grupo foram submetidos ao imunossupressor ciclofosfamida (Genuxal® - Baxter Healthcare, Deerfield), o qual pode induzir uma reagudização, caracterizada pelo retorno de parasitemias patentes em animais não curados. Os animais receberam, via i.p., três ciclos de 50 mg/kg/dia de ciclofosfamida por quatro dias consecutivos, com três dias de intervalo entre cada ciclo (CALABRESE et al., 1996). Ao final de cada ciclo e por mais duas semanas após o término, os animais foram avaliados pelo exame a fresco.

A mortalidade foi acompanhada a cada dois dias ao longo de todo o experimento. As hemoculturas e as coletas de sangue para PCR foram realizadas ao final do experimento, completando 150 dias de infecção e 60 dias de intervalo pós-tratamento. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a avaliação histopatológica do coração, fígado, baço, colón, esôfago, músculo esquético e, nos animais imunossuprimidos, o cérebro também foi avaliado. Um fragmento do coração foi armazenado em etanol 70% para posterior PCR e qPCR.

4.8 Exames para o monitoramento da infecção e da eficácia do tratamento

4.8.1 Exame parasitológico a fresco

A parasitemia foi avaliada através de exame a fresco de 5 µl de sangue obtido da cauda dos animais através do método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962), conforme descrito no item 4.5.1.

4.8.2 Hemocultura

Os animais foram sedados com éter etílico e 0,5 ml de sangue foi obtido pelo plexo retroorbital em condições assépticas. O sangue foi transferido para tubos contendo 1 ml de meio de cultura LIT acrescido de SBF 10%, 10 µg/ml de estreptomicina e 10 UI/ml de penicilina. As culturas foram mantidas a 28°C, examinadas em intervalos de 15 dias até o 120º dia, com trocas quinzenais do meio de cultura.

4.8.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O sangue e/ou os fragmentos dos órgãos coletados e preservados em etanol -20°C foram macerados e ressuspensos em tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 7,4; EDTA 25 mM; NaCl 10 mM; SDS 1%; proteinase K 50 µg.ml⁻¹). Após incubação a 42°C por 12 horas, foi realizada a extração do DNA pelo método fenol-clorofórmio, segundo Sambrook e colaboradores (1989). Os ácidos nucleicos foram precipitados em isopropanol na proporção 1:1 e incubados a -20°C por 2 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 14.500 x g por 30 minutos e o sedimento foi lavado em etanol 70% gelado e seco à temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi então ressuspensado em 50 µl de água Milli-Q contendo RNase (10 mg/ml) e incubado por uma hora a 37°C seguido por estocagem em freezer a -20°C. A quantidade de DNA foi estimada por comparação com padrões com quantidades

conhecidas em gel agarose 0,8% corado com brometo de etídio e por espectrofotometria.

Para a detecção do parasito via PCR, foram utilizados os iniciadores S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGGAGATGCATGA-3') e S36 (5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad), específicos para quatro regiões variáveis do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*, gerando um amplicon de 330 pb, visualizados em gel de agarose 2% e corado pelo brometo de etídeo, conforme descrito por Andrade e colaboradores (1999).

4.8.4 Histopatologia

Para a avaliação histopatológica, fragmentos do coração, baço, fígado, esôfago, cólon, músculo quadríceps e cérebro foram fixadas em solução formalina 10% tamponada com PBS pH 7,4 por 72 horas. Após desidratação em etanol, as amostras foram embebidas e incluídas em parafina líquida a 64°C. Os tecidos parafinizados foram submetidos a cortes histológicos seriados de 5 µm, corados com hemotoxilina-eosina (H&E) e examinados em microscópio ótico, visando à pesquisa de lesões anátomo-histopatológicas (infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares, necrose e mineralização) e presença de parasitos (pseudocistos de parasitos “ninho de amastigotas”), segundo Andrade e colaboradores (1999).

4.9 Avaliação do potencial anti-inflamatório na infecção experimental pelo *T. cruzi*

4.9.1 Infecção e tratamento

Grupos de oito camundongos Swiss, machos, com 4,5 semanas de idade, pesando entre 25 a 30 g, foram inoculados i.p. com 10³ tripomastigotas de cultura em fase estacionária da cepa Colombiana de *T. cruzi*, a qual tem miotropismo, causando acentuada miocardite e miosite (FEDERICI et al., 1964). Três semanas após, a infecção dos animais foi confirmada através de exame a fresco. Dois meses após a infecção, um grupo de oito camundongos foi tratado por gavagem diariamente com uma dose de 50 mg/kg de galato de dodecila por 21 dias e o outro grupo recebeu o veículo (trigliceril CM[®] Support Produtos Nutricionais Ltda, São Paulo + DMSO 2,5%). Para as análises histopatológicas e a avaliação de citocinas transcritas no tecido cardíaco, três a quatro animais por grupo foram sacrificados antes, no meio e final do tratamento. Paralelamente, três animais do mesmo grupo, mas não

submetidos à infecção e ao tratamento (*naive*) foram também sacrificados e utilizados como controle negativo. Para a avaliação histopatológica foram coletados coração e músculo esquelético da coxa, cujas amostras foram processadas conforme descrito no item 4.8.4. Para a análise do perfil de citocinas transcritas, o coração foi armazenado em uma solução de RNA *later* (Sigma-Aldrich, Saint Louis) e armazenado a -20°C até o uso.

4.9.2 Avaliação do perfil de citocinas transcritas através de RT-qPCR

A análise das citocinas foi realizada através de RT-qPCR utilizando iniciadores para TNF e IFN- γ (pró-inflamatórias), IL-10 (anti-inflamatória) e RNA ribossomal 18S (controle de expressão constitutiva), conforme descrito por Lanza e colaboradores (2010). Para tanto, a região apical do coração armazenado em RNA *later* foi macerada em 500 μ l de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad) com auxílio do aparelho para ruptura tecidual (*Tissue ruptor*), realizando lavagens sucessivas da sonda em H₂O MilliQ tratada com DEPC, álcool e novamente na água tratada, antes do início do procedimento e entre os diferentes grupos. Em seguida, foram adicionados 200 μ l de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos. Após 15 minutos de repouso em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos para a formação de fases. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo ao qual foram adicionados 500 μ l de isopropanol. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e 1 ml da solução de etanol 75% em H₂O MilliQ DEPC foi adicionado. Após breve agitação vigorosa, as amostras foram centrifugadas a 7.500 x g a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante descartado e após a total evaporação do etanol, as amostras foram suspendidas em 50 μ l de H₂O MilliQ DEPC e incubadas em banho seco a 56°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas a digestão com 2 U DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a DNase foi inativada a 65°C por 10 minutos, o RNA dosado em espectrofotômetro Modelo a 260 nm e a armazenado a -80°C até a realização da RT-qPCR.

A síntese dos cDNAs foi realizada utilizando-se a transcriptase reversa M-MLV, conforme protocolo do fabricante (Invitrogen Life

Technologies, Carlsbad). Basicamente, 500 ng de cada uma das amostras de RNA foram incubados com 1 µl de oligodT (500 µg/ml), 2 µl de dNTP a 2 mM em um volume final de 12 µl por 5 minutos a 65°C, seguido de banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µl de tampão da enzima 5x, 2 µl de ditioneitol (DTT), 1 µl de RNaseOUT (400 U/µl) e incubadas por 37°C por 2 minutos em termocilador. Após a adição de 200 U da transcriptase reversa, a reação foi incubada por 37°C por 50 minutos, seguido de mais 15 minutos a 70°C.

A reação de qPCR foi realizada em um volume final de 10 µl contendo 1 µl de cDNA; 10 µM dos oligonucleotídeos (Quadro 1), 5 µl de 2x SYBR® Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems). A leitura foi no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando a opção ‘quantificação absoluta’. As condições de termociclagem foram 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por um minuto. Após a amplificação, os produtos de DNA foram desnaturados para obtenção da curva de dissociação. O nível relativo da expressão gênica foi determinado pelo método comparativo *cycle threshold* (Ct), conforme descrito pelo fabricante, sendo que cada amostra foi normalizada pelo RNA ribossomal 18S e expresso como quantidade relativa (RQ) comparada ao grupo *naive*.

Quadro 1. Oligonucleotídeos selecionados para a RT-qPCR e o peso molecular esperado para cada um dos amplicons

Gene	Forward iniciador	Reverse iniciador	Amplicon
18S	CACGGCCGGTACAGTGAAAC	CCCCTCGGCATGTATTAGCT	119 pb
IFN-γ	CTTGGATATCTGGAGGAAGCTGGC	GCGCTGGACCTGTGGGTTGTTGA	235 pb
TNF	AAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAG	CCCTTGAAGAGAACCTGGGAGTAG	181 pb
IL-10	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	191 pb

Fonte: Lanza et al., 2010.

4.9.3 Estimativa da carga parasitária no tecido cardíaco por qPCR

Para a extração de DNA, aproximadamente ¼ do coração foi macerado e processado conforme descrito no item 4.8.3. Para estimar a

carga parasitária foram utilizados os iniciadores D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') e D72 (5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'), os quais são específicos para a região divergente do gene 24S α rDNA, gerando um amplicon de 110 pb (SOUTO et al., 1996). Para a normalização das amostras, foram utilizados os primers para a região 18S (Quadro 1). As reações foram realizadas em um volume final de 10 μ l, contendo 10 μ M dos iniciadores, 10 ng de DNA e 5 μ l de 2x SYBR[®] Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems). As leituras foram realizadas no equipamento StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando a opção 'quantificação absoluta'. As condições de termociclagem foram 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por um minuto. Após a amplificação, os produtos de DNA foram desnaturados para obtenção da curva de dissociação. A estimativa da quantidade de parasitos no tecido cardíaco foi realizada pela análise dos valores de fluorescência de cada amplicon.

4.10 Análise estatística dos ensaios *in vivo*

A média e o desvio padrão foram calculados e as diferenças entre os grupos foram determinadas utilizando-se o teste de análise de variância não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA) no programa Instat3, segundo Ferreira e colaboradores (2007). As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade tripanocida frente a formas tripomastigotas sanguíneas

Os ensaios de atividade *ex vivo* mostraram que os ésteres de galato a 200 μM provocaram taxas de mortalidade variando de 58 a 79% sobre formas tripomastigotas sanguíneas após 48 horas de incubação (Tabela 1). Além disso, os galatos de octila, dodecila e tetradecila mantiveram um efeito tripanocida acima de 50% na concentração de 50 μM . Entretanto, nenhum dos compostos foi mais ativo do que o quimioprolifático violeta de genciana.

Tabela 1. Atividade tripanocida *ex vivo* frente a formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Composto	Percentuais de mortalidade (%)	
	200 μM	50 μM
Ácido gálico	24,32 \pm 5,41	9,46 \pm 4,05
Galato de Octila	79,05 \pm 2,95	51,0 \pm 4,05
Galato de Decila	75,0 \pm 7,73	45,95 \pm 11,03
Galato de Undecila	58,11 \pm 4,05	48,65 \pm 2,21
Galato de Dodecila	72,52 \pm 9,88	58,78 \pm 7,73
Galato de Tetradecila	77,48 \pm 9,19	60,36 \pm 5,55
Violeta de genciana	100 \pm 0	100 \pm 0

Os resultados expressam a média \pm desvio padrão de três réplicas em duplicata.

5.2 Atividade tripanocida frente a formas amastigotas intracelulares em células Vero e macrófagos murinos

Inicialmente a atividade tripanocida dos galatos foi avaliada contra formas amastigotas da cepa Y em células Vero. Diante da significativa atividade antiparasitária contra formas intracelulares, a cepa Colombiana, que apresenta resistência *in vivo* ao benzonidazol, também foi incluída nos ensaios. Nossos resultados mostram que todos os compostos em teste foram mais ativos do que o benzonidazol contra ambas as cepas (Figura 6; Tabela 2). A cepa Colombiana se mostrou mais sensível com taxas de inibição variando entre 46 a 95% na concentração de 3 μM . Nesta mesma concentração, somente o galato de dodecila apresentou uma expressiva atividade (72%) contra a cepa Y (Figuras 6 e 7B). Embora mais ativos do que o benzonidazol, os galatos também foram mais citotóxicos, sendo que somente o galato de dodecila apresentou índice de seletividade acima de 50 contra ambas as cepas de *T. cruzi* (Tabela 2).

O efeito tripanocida sobre amastigotas intracelulares também foi avaliado em células fagocíticas profissionais não proliferativas. A Tabela 3 mostra os percentuais de inibição (PI) apresentados pelos diferentes derivados do ácido gálico frente a formas intracelulares da cepa Y em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Na concentração de 10 μM , foi detectada uma expressiva atividade tripanocida dos galatos de decila e dodecila, cujos valores de PI foram, respectivamente, de 99,3 a 97,2%, comparáveis ao do benzonidazol (88,2%) (Tabela 3, Figuras 8B e C). Ambos os galatos mantiveram uma expressiva atividade na concentração de 2 μM , mas foram inativos a 0,2 μM . A dosagem de nitrito no sobrenadante destes bioensaios revelou a ausência de óxido nítrico (dados não mostrados). O ácido gálico não foi citotóxico e nem ativo em nenhum dos dois modelos celulares (Figuras 7A e 8A).

Em conjunto, estes resultados mostram o potencial tripanocida *in vitro* de alguns ésteres de galato, sobretudo do galato de dodecila e que a destruição dos amastigotas intracelulares independe da ativação da via microbicida do óxido nítrico.

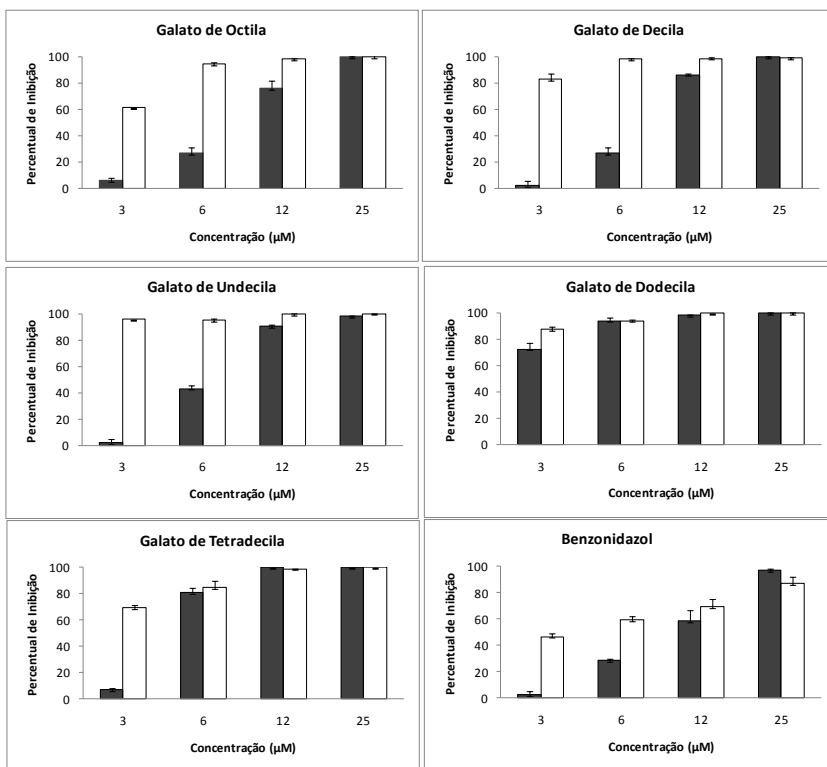


Figura 6. Atividade antiparasitária dos ésteres de galato frente a amastigotas das cepas Y (barras escuras) e Colombiana (barras claras) de *Trypanosoma cruzi* em células Vero. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão de três réplicas em duplicata.

Tabela 2. Efeito dos ésteres de galato, expresso como CI_{50} sobre formas amastigotas intracelulares das cepas Y e Colombiana de *Trypanosoma cruzi* e índice de seletividade (IS) em relação às células Vero

Compostos	Vero	Cepa Y		Cepa Colombiana	
	CI_{50} (μM)	CI_{50} (μM)	IS*	CI_{50} (μM)	IS*
Ácido gálico	> 500	sem atividade		sem atividade	
Galato de Octila	60,1	$9,7 \pm 3,3$	6,2	< 1	> 60,1
Galato de Decila	35,7	$8,7 \pm 1,2$	4,1	< 1	> 35,7
Galato de Undecila	39,8	$4,1 \pm 2,7$	9,7	< 1	> 39,8
Galato de Dodecila	52,0	< 1	> 52	< 1	> 52
Galato de Tetradecila	36,0	$5,9 \pm 0,7$	6,1	< 1	> 36
Benzonidazol	> 500	$11,4 \pm 1,8$	> 44	$2,7 \pm 0,8$	> 188

*Índice de seletividade = citotoxicidade/efeito tripanocida.

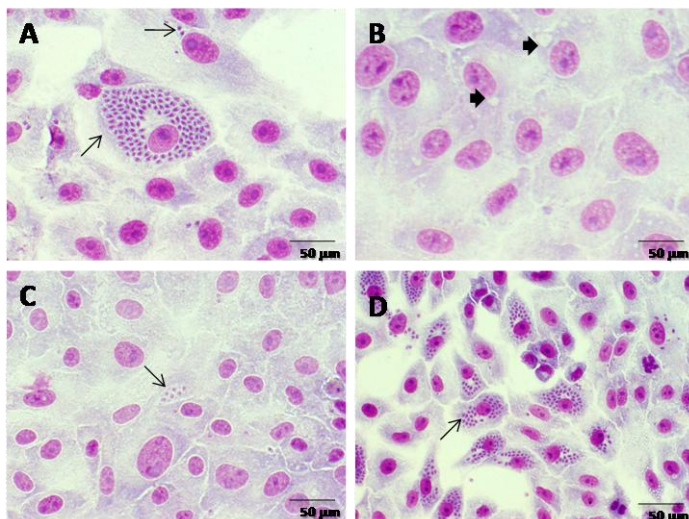


Figura 7. Atividade tripanocida do ácido gálico e do galato de dodecila sobre formas amastigotas em células Vero. (A) Ácido gálico 25 μM ; (B) Galato de dodecila 3 μM ; (C) benznidazol 6 μM ; (D) controle. A seta estreita indica os amastigotas intracelulares e a seta larga os vacúolos. Aumento: 200x (D) e 400x (A-C).

Tabela 3. Atividade tripanocida de galatos comerciais frente a amastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos derivados de medula óssea

Compostos	Percentual de Inibição (PI)	
	10 μ M	2 μ M
Ácido gálico	Sem atividade	Sem atividade
Galato de Octila	Sem atividade	Sem atividade
Galato de Decila	99,3 \pm 0,7	82,8 \pm 2,5
Galato de Undecila	Citotóxico	Sem atividade
Galato de Dodecila	97,2 \pm 1,0	79,2 \pm 3,8
Galato de Tetradecila	Citotóxico	Sem atividade
Benzonidazol	88,2 \pm 3,2	Sem atividade

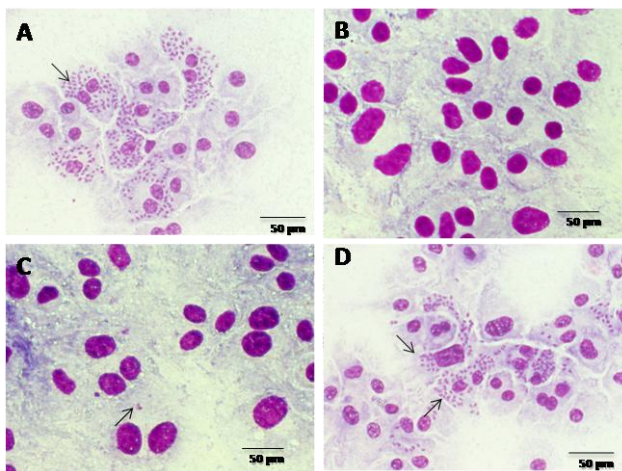


Figura 8. Atividade tripanocida do ácido gálico e do galato de dodecila sobre formas amastigotas em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos Balb/c. As monocamadas foram incubadas por 48 horas com 10 μ M de (A) ácido gálico; (B) galato de dodecila ou (C) benznidazol. (D) controle. A seta indica os amastigotas intracelulares. Aumento: 200x (A, D) e 400x (B, C).

5.3 Avaliação do efeito do tratamento combinado *in vitro*

Com base nos percentuais de inibição e nos valores de CI_{50} determinados nos ensaios anteriores com células Vero (Tabela 2), a avaliação do efeito do tratamento combinado do galato de dodecila com o benzonidazol foi realizada utilizando-se a proporção de 1:10 de cada um destes compostos, respectivamente. A Figura 9 mostra o efeito isolado e combinado para quatro concentrações distintas. Até a terceira combinação (2:20 μM) houve um aumento na atividade tripanocida, quando os dois compostos foram utilizados simultaneamente em comparação a cada um deles isoladamente, na mesma concentração. Este efeito foi maior ($p < 0,05$) na primeira combinação (0,5:5 μM) para ambos os compostos e na segunda combinação (1:10 μM) somente para o galato de dodecila. Desta forma, isoladamente o galato de dodecila a 0,5 μM e o benzonidazol a 5 μM ocasionaram, respectivamente, 20% e 49,5% de inibição. Quando combinados, nestas mesmas concentrações, o efeito tripanocida aumentou significativamente para cerca de 70%.

Utilizando o programa CompuSyn® foi determinado o índice de combinação que foi de 0,98 e 1,0 para as duas primeiras combinações, respectivamente, mostrando que o aumento na atividade não representa sinergismo, mas sim, um efeito aditivo (Figura 10). Desta forma, os valores de DRI (*dose-reduction index*) sugerem que, para um efeito tripanocida *in vitro* de 97%, a dose do galato de dodecila pode ser reduzida em 1,3 vezes e a do benzonidazol em 2,8 vezes, quando em tratamento combinado.

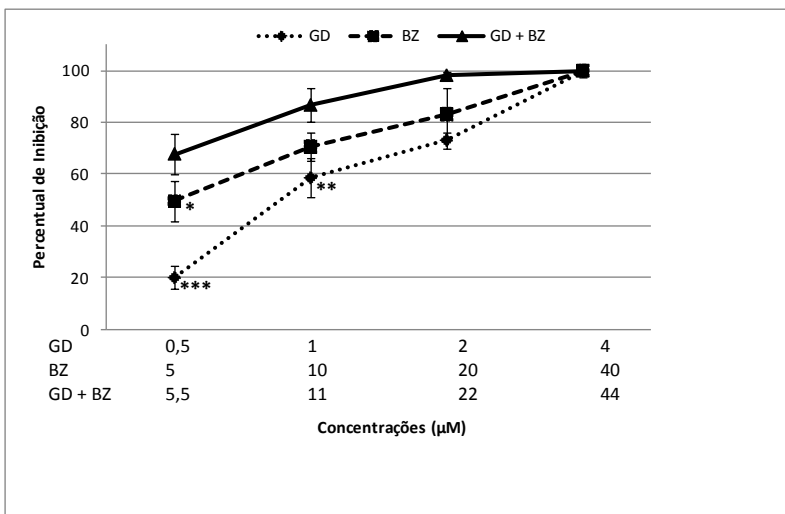


Figura 9. Avaliação do efeito tripanocida isolado e combinado do galato de dodecila e do benzonidazol. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três réplicas em duplicata. GD= galato de dodecila; BZ= benzonidazol. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao efeito combinado.

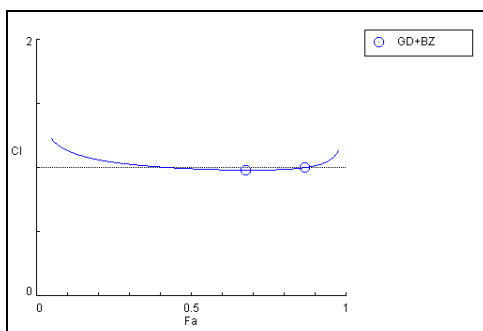


Figura 10. Análise do efeito combinado do galato de dodecila (GD) e do benzonidazol (BZ), segundo o programa CompuSyn®. Fa= efeito tripanocida; CI= índice de combinação. Observa-se que para o efeito de 68% e 87% observados nas duas primeiras combinações, o valor de $CI = 1,0$, sugerindo um efeito aditivo no tratamento combinado.

5.4 Análise das alterações ultraestruturais por MET induzidas pelo galato de dodecila em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares

O galato de dodecila, por apresentar o maior índice de seletividade (Tabela 2), foi selecionado para a investigação das modificações ultraestruturais induzidas em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

A análise ultraestrutural mostrou que as formas flageladas (epimastigotas) não submetidas ao tratamento mantiveram todas as suas características classicamente descritas: forma alongada, flagelo terminal, bolsa flagelar, núcleo, mitocôndria única contendo o cinetoplasto, integridade de membranas celulares e organelas, inclusive de reservossomos (Figura 11A).

Após 48 horas de incubação com 50 μ M de galato de dodecila (Figura 11C, D), os epimastigotas apresentaram alterações morfológicas, marcadas por uma expressiva perda de reservossomos e intumescimento da mitocôndria, mas o DNA do cinetoplasto (kDNA) permaneceu intacto. O citoplasma dos parasitos tratados apresentou muitos vacúolos e com sinais de esvaziamento, sugerindo a presença de poros na membrana, o que precede a total lise das células após 72 horas de incubação com o galato de dodecila.

As células Vero infectadas e não tratadas apresentaram-se intensamente parasitadas, contendo amastigotas íntegros nos quais foram observados o clássico flagelo curto e invaginado, núcleo e cinetoplasto contido em sua única mitocôndria (Figura 12A). O tratamento com galato de dodecila a 2 μ M por 48 horas reduziu expressivamente a taxa de infecção por formas amastigotas em células Vero, com sinais de intensa desintegração dos parasitos e consequente vacuolização da célula hospedeira (Figura 12D). Amastigotas residuais apresentaram alterações no núcleo e na mitocôndria, assim como uma expressiva deformação da membrana citoplasmática (Figura 12C). Por outro lado, nas células Vero não foram observados sinais significativos de dano celular, confirmando a seletividade do composto (IS >50, conforme consta na Tabela 2).

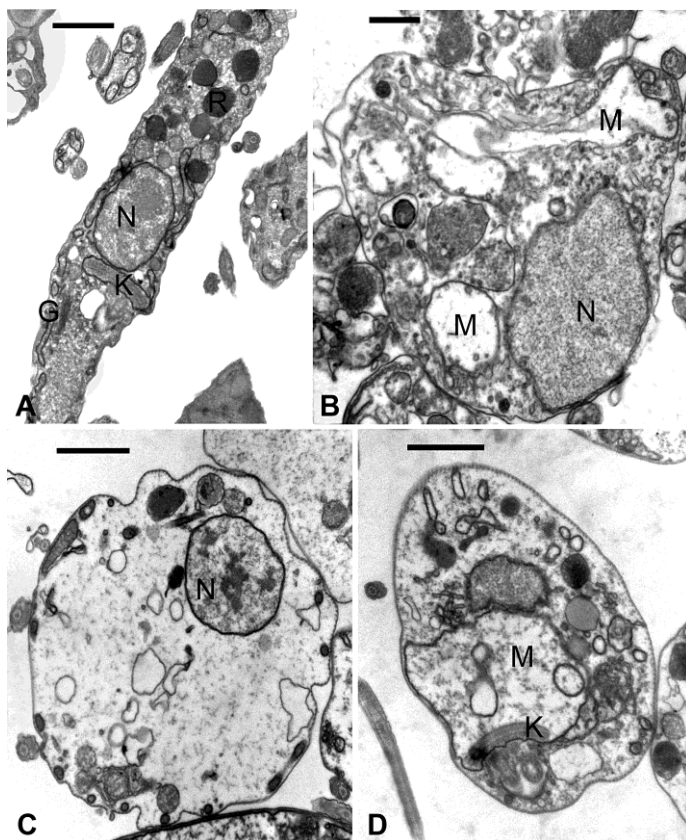


Figura 11. Alterações ultraestruturais em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* induzidas pelo galato de dodecila após 48h de incubação. A- controle, mostrando o núcleo (N), cinetoplasto (K), complexo de Golgi (G), reservossomos (R) e mitocôndria (M); B- benznidazol 50 μ M de; C, D- galato de dodecila 50 μ M. Observa-se esvaziamento do citoplasma, diminuição no número de reservossomos e intumescimento da mitocôndria. Barras: 1 μ m em A, C, D e 0,5 μ m em B.

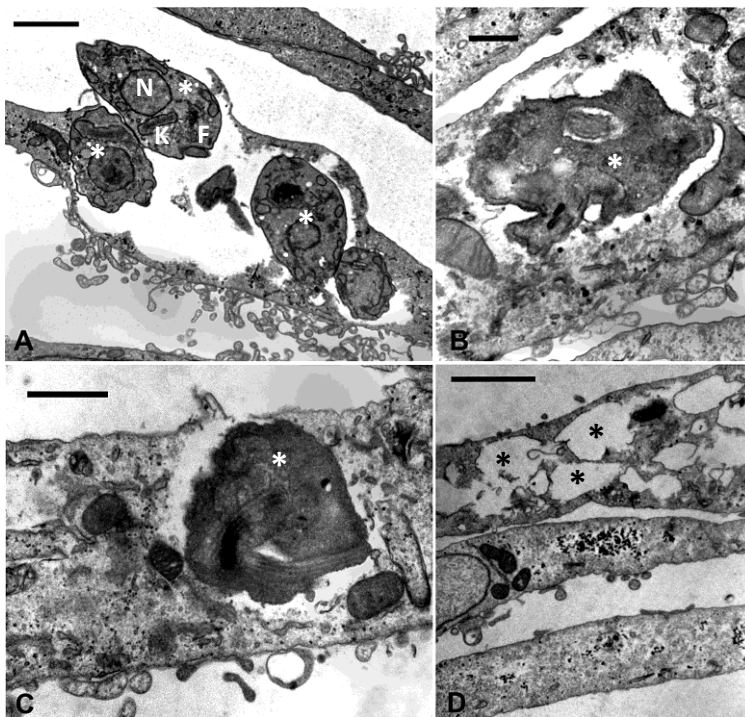


Figura 12. Alterações ultraestruturais em formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em células Vero induzidas pelo galato de dodecila após 48h de incubação. A- controle, mostrando o núcleo (N), cinetoplasto (K) e flagelo (F); B- benznidazol 50 μM ; D, E- galato de dodecila 2 μM . Observa-se intensa degradação dos parasitos e vacuolização da célula hospedeira (D) e expressiva degradação da membrana plasmática nos amastigotas residuais (C). Asteriscos brancos indicam os amastigotas e os asteriscos pretos os amastigotas residuais. Barras: 2 μm em A, D; 1 μm em C e 0,5 μm em B.

5.5 Ensaios de inibição *in vitro* da tripanotona redutase recombinante de *T. cruzi* (TcTR) e glutationa redutase (GR)

5.5.1 Expressão heteróloga e purificação da TcTR

A expressão heteróloga de TcTR foi confirmada através de SDS-PAGE pela visualização, no extrato protéico solúvel bacteriano, de uma banda proeminente de aproximadamente 55 kDa, a qual está de acordo com o esperado teórico (Figura 13A). A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em condições nativas, com um rendimento de purificação de 155 µg a partir de 30 ml de cultivo. Todos os passos referentes à purificação foram confirmados por *western blot* utilizando anticorpo anti-HisTag, identificando na banda de ~55 kDa a presença da cauda de seis histidinas conferidas pelo vetor de expressão (Figura 13B).

O material eluído da coluna foi submetido ao teste de atividade enzimática em diferentes concentrações (Figura 14). Este ensaio revelou que a TcTR heteróloga foi expressa e purificada como uma enzima ativa e, quando usada a 230 ng, manteve uma reação linear ($r = 0,9964$), cujo delta de absorbância foi de 0,014/minuto, permitindo estabelecer o uso de 230 ng de TcTR/poço para os subseqüentes ensaios de inibição (Figura 14).

5.5.2 Ensaio de inibição da TcTR e GR

Na triagem, utilizando os compostos a 100 µM somente o ácido gálico e o galato de decila reduziram a atividade da TcTR em mais de 50% (Figura 15). A curva de concentração dos compostos mostrou que o galato de decila inibiu a TcTR até a concentração de 25 µM, apresentando uma CI₅₀ de 78,9 µM (Figura 16B). Já o ácido gálico foi mais potente, apresentando uma CI₅₀ de 45,6 µM (Figura 17). Esta inibição induzida pelo ácido gálico também foi maior do que aquela com a clomipramina, que nas condições experimentais testadas, apresentou uma CI₅₀ de 63,6 µM (Figura 16A). Além disso, o ácido gálico inibiu especificamente a TcTR, sem interferir na atividade da GR em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 17). Os compostos na ausência da enzima, não interferiram na absorbância em nenhum dos ensaios enzimáticos.

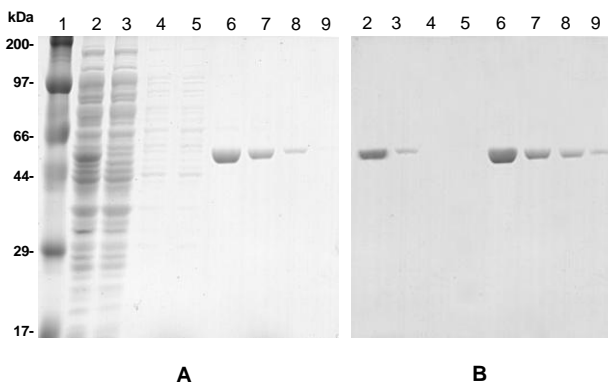


Figura 13. SDS-PAGE (painel A) e *western blot* (painel B) da tripanotiona redutase heteróloga de *Trypanosoma cruzi*. As canaletas representam: 1- padrão de peso molecular (Broad range marker- Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg); 2- sobrenadante do extrato bacteriano após sonicação; 3- proteínas que não se ligaram na coluna de afinidade; 4 e 5- primeira e segunda lavagem pós-coluna; 6 a 9- primeira a quarta eluições contendo a *TcTR* purificada.

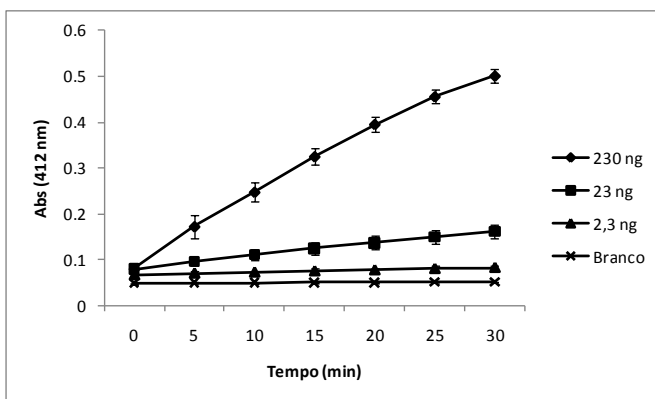


Figura 14. Teste de atividade da *TcTR* após a purificação e padronização da concentração enzimática para os ensaios de inibição.

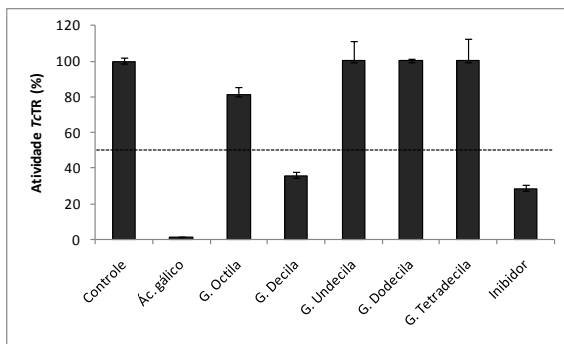


Figura 15. Triagem dos compostos com potencial inibitório da TcTR. Todos os compostos, inclusive o inibidor (clomipramina), foram utilizados a 100 μ M.

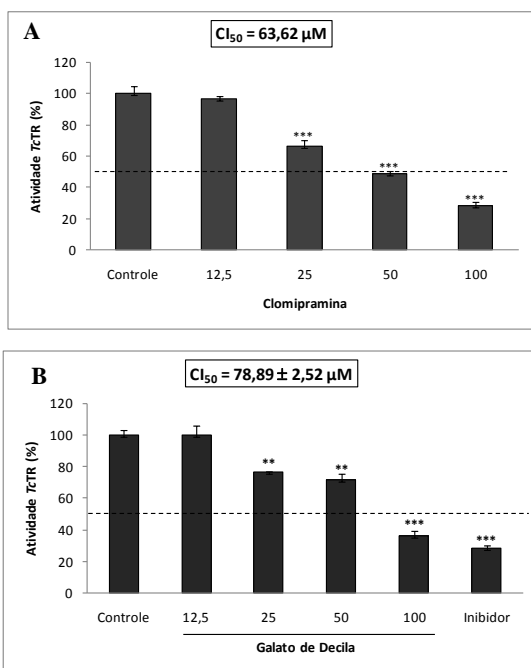


Figura 16. Determinação da CI_{50} do inibidor clomipramina (painel A) e do galato de decila (painel B) para TcTR. Os asteriscos representam inibição significativa (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) em relação ao controle.

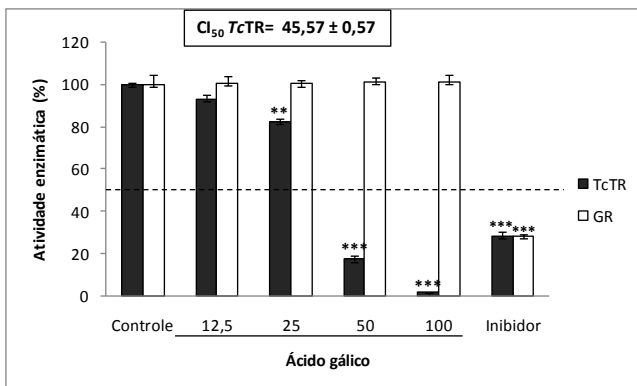


Figura 17. Avaliação do efeito inibitório do ácido gálico sobre a TcTR (barras escuras) comparado com a GR (barras claras). Os inibidores utilizados para a TcTR e GR foram, respectivamente, a clomipramina 100 μM e a carmustina (BCNU) a 10 μM . Os asteriscos representam inibição significativa (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) em relação ao controle.

5.6 Avaliação da atividade tripanocida *in vivo* na fase aguda

5.6.1 Triagem *in vivo* de compostos ativos (tratamento agudo, *clearance*)

A expressiva atividade tripanocida *in vitro* e o relato da administração do ácido gálico e seus ésteres em outros modelos murinos, aparentemente sem toxicidade, nos estimularam a testar, pela primeira vez, a atividade tripanocida *in vivo* dos ésteres de galato tanto no modelo agudo quanto crônico da infecção murina.

A avaliação inicial da atividade tripanocida na fase aguda foi realizada segundo Filardi e Brener (1984), cujo método consiste em avaliar a rápida diminuição da parasitemia após 6 e 24 horas de um tratamento agudo em dose única e alta (500 mg/kg). A administração por via oral mostrou, contrariamente ao benzonidazol, que nenhum dos galatos foi capaz de controlar a parasitemia e a mortalidade (Figura 18, Tabela 4). O tempo médio de sobrevivência após o tratamento experimental variou entre 14 a 27 dias (Tabela 4). Nas primeiras 6 horas após o tratamento todos os grupos experimentais apresentaram parasitemias mais elevadas do que o controle, cujos valores foram 2 a 2,5 vezes maiores nos animais que receberam os galato de octila, decila e tetradecila. Entretanto, nas 24 horas seguintes ao tratamento, todos os

grupos apresentaram parasitemias semelhantes ao controle, com exceção dos animais tratados com benzonidazol, que não mostraram parasitos circulantes (Figura 18). Para verificar se a administração pela via oral poderia estar envolvida na ineficácia dos compostos, a via intraperitoneal (i.p.) também foi avaliada. Entretanto, a administração dos galatos pela via i.p. ocasionou uma rápida elevação da parasitemia e mortalidade, cujo tempo médio de sobrevivência, após o tratamento, variou de menos de seis horas a seis dias (dados não mostrados). Diante da ineficácia da via i.p, somada às manifestações de hipotermia, emagrecimento, contração abdominal e baixa sobrevivência após a injeção, esta via de administração foi abandonada.

Embora a correspondência entre os resultados obtidos com este método rápido de triagem e o método de tratamento convencional de longa duração seja aceitável, algumas discrepâncias podem surgir. Desta forma, o efeito tripanocida de um tratamento mais prolongado também foi avaliado no modelo murino de infecção aguda.

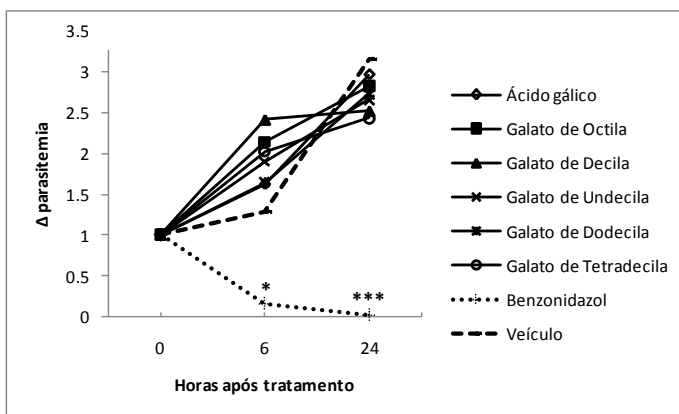


Figura 18. Efeito do tratamento agudo (*clearance*) dos galatos sobre a parasitemia de camundongos Swiss em fase aguda da infecção com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Avaliação da parasitemia de camundongos Swiss infectados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após o tratamento agudo com 500 mg/kg de diferentes galatos administrados por via oral, iniciado no 7º dia de infecção. Os resultados representam a variação média da parasitemia de 10 animais em dois experimentos independentes. Os asteriscos representam diminuição significativa (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) em relação ao controle (veículo: DMSO 10% + trigliceril).

5.6.2 Avaliação da atividade tripanocida na fase aguda

O tratamento diário dos camundongos durante sete dias, utilizando-se uma dose de 50 mg/kg, não alterou a taxa de sobrevivência dos animais em relação ao tratamento agudo, com exceção do galato de tetradecila que elevou a taxa de mortalidade de 20% para 70% (Tabela 4). Além disso, independentemente do tratamento ser iniciado no segundo dia após a inoculação ou no pico parasitêmico, nenhum dos compostos foi capaz de alterar o curso da infecção e a sobrevivência dos animais (Figuras 18, 19; Tabela 4).

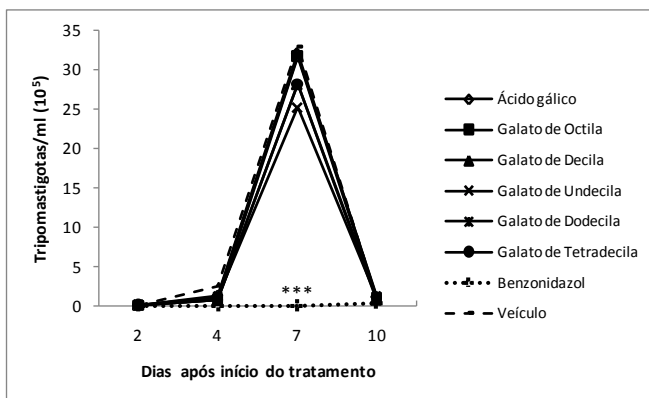


Figura 19. Efeito dos galatos sobre a parasitemia de camundongos Swiss infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* ao longo de sete dias de tratamento, iniciado 24 horas após a infecção. Camundongos Swiss foram infectados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos e tratados v.o. (gavagem) com 50 mg/kg/dia uma vez ao dia durante sete dias consecutivos com diferentes ésteres de galato ou benzonidazol. Os resultados representam a média de 10 animais em dois experimentos independentes. *** $p < 0,001$ representa diminuição significativa em relação ao controle (veículo: DMSO 2,5% + trigliceril).

Tabela 4. Avaliação da mortalidade de camundongos Swiss infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* submetidos a dois esquemas terapêuticos com diferentes galatos administrados pela via oral, monitorada até o 30º dia pós-tratamento. Os resultados representam a média de 10 animais em dois experimentos independentes

Esquema terapêutico (início p.i.)	Percentual de sobreviventes	Média de sobrevida p.i. em dias (variação)
500 mg/kg/ 1 dose (7º dia)		
Ácido gálico	40	26,8 (24-30)
Galato de Octila	60	27,2 (22-30)
Galato de Decila	80	24,8 (21-30)
Galato de Undecila	40	14,6 (9-30)
Galato de Dodecila	60	21,8 (17-30)
Galato de Tetradecila	80	21 (19-30)
Benzonidazol	100	30
Veículo	20	23,5 (14-30)
50 mg/kg/ 7 doses (2º dia)		
Ácido gálico	60	21,3 (7-30)
Galato de Octila	60	24,8 (8-30)
Galato de Decila	60	23,1 (4-30)
Galato de Undecila	40	20,3 (6-30)
Galato de Dodecila	50	20,6 (6-30)
Galato de Tetradecila	30	18 (6-30)
Benzonidazol	100	30
Veículo	40	19 (9-30)

p.i.= pós infecção.

A despeito dos resultados frustrantes no modelo agudo da doença de Chagas murina, o estímulo para investigar o efeito tripanocida dos galatos no modelo crônico se baseou nos seguintes motivos: 1) maior atividade *in vitro* sobre amastigotas intracelulares (predominantes na fase crônica) do que sobre formas tripomastigotas sanguíneas; 2) confirmação desta atividade tripanocida *in vitro* frente a formas amastigotas interiorizadas em macrófagos murinos derivados de medula óssea; 3) evidências *in vitro* de um mecanismo de ação direto sobre os parasitos; 4) carência de fármacos eficazes na fase crônica da doença de Chagas humana, na qual ocorre a maioria dos diagnósticos.

5.7 Avaliação da atividade tripanocida na fase crônica

O efeito tripanocida dos galatos na fase crônica foi realizado utilizando-se o galato de dodecila por já estar disponível comercialmente, dispensando a etapa adicional de esterificação. O ácido gálico, embora não tenha apresentado atividade tripanocida, foi utilizado como um controle adicional. Uma vez que um efeito aditivo foi observado nos ensaios *in vitro* (Figuras 9, 10), a possibilidade de utilizar uma dose reduzida do benzonidazol (5 mg/kg) associado ao galato de dodecila também foi avaliada. Para tanto, grupos de 10 a 15 camundongos Swiss foram inoculados i.p. com 50 tripomastigotas sanguíneos. Após sete dias, a infecção foi confirmada em todos os animais pelo exame a fresco. Com o intuito de prevenir a mortalidade e possibilitar a cronificação, os camundongos foram tratados oralmente com uma dose de 100 mg/kg de benzonidazol. Esta dose diminuiu a parasitemia, mas não proporcionou a cura, como comprovado por um novo exame a fresco de sangue realizado cinco dias após o tratamento agudo, no qual todos os animais apresentaram-se positivos. A fase crônica foi confirmada pela parasitemia subpatente e sorologia positiva, 60 dias após a infecção, quando foi instituído o tratamento com os compostos em teste (50 mg/kg/dia, durante 28 dias consecutivos).

Durante o tratamento, nenhum camundongo apresentou exame a fresco positivo e todos completaram o tratamento. Após o tratamento, somente em animais imunossuprimidos com ciclofosfamida foi observado o retorno da parasitemia patente, caracterizando a falha terapêutica. Entre estes animais que reagudizaram, três pertenciam ao grupo tratado com o veículo e um camundongo a cada um dos grupos tratados com ácido gálico, galato de dodecila isolado e combinado com benzonidazol (Tabela 5). Todos os animais que evoluíram a óbito

tinham sido submetidos a ciclofosfamida, apresentando expressiva perda ponderal e estado geral debilitado (Tabela 5).

Sessenta dias após o término do tratamento, os animais sobreviventes e com exame a fresco persistentemente negativo, foram submetidos à hemocultura e à coleta de sangue periférico para posterior PCR. Em seguida, foram sacrificados para a avaliação histopatológica e qPCR.

Com exceção do grupo que recebeu benzonidazol a 100 mg/kg, todos os demais apresentaram hemoculturas positivas. O percentual de positividade foi de 37,5% para o grupo tratado com ácido gálico; 76,9% para o grupo tratado com galato de dodecila; 69,2% para o grupo que recebeu o tratamento combinado; 70% para o grupo tratado com benzonidazol a 5 mg/kg e 85,7% para o grupo controle (Tabela 5). O maior número de hemoculturas positivas foi observado no 45º dia de cultivo, sugerindo uma carga parasitária homogênea entre os grupos experimentais (Figura 20). Após 60 dias de cultivo não foram observadas hemoculturas positivas até o final da análise (120 dias).

Animais com hemocultura negativa também foram avaliados por PCR de sangue periférico. A PCR (Figura 21) revelou taxas de positividade variando entre 40% a 100% entre os camundongos com hemocultura negativa. Os animais que tiveram sucessivos exames parasitológicos e PCR negativos após o tratamento foram considerados “curados”. Desta forma, observou-se uma expressiva falha terapêutica nos grupos experimentais quando comparados ao tratamento preconizado com benzonidazol. Curiosamente, o benzonidazol a 5 mg/kg sozinho foi mais efetivo do que quando combinado com o galato de dodecila (Tabela 5).

A avaliação histopatológica de diferentes órgãos mostrou ausência de ninhos de amastigotas em todas as amostras, possivelmente pela baixa carga parasitária inerente ao modelo crônico. Embora o parasito não tenha sido visualizado, a maioria (87,5%) dos animais do grupo veículo apresentou significativos focos de infiltrado mononuclear/linfomononuclear, com tendência a confluência, sugerindo infecção ativa (Tabela 6; Figura 22D). Além disso, nos cortes histológicos de dois camundongos que reagudizaram após a administração de ciclofosfamida, foi observada a presença de um moderado infiltrado linfóide perivascular com presença de monócitos no córtex (não mostrado), compatível com o quadro de meningoencefalite chagásica. Por outro lado, a análise histopatológica dos camundongos tratados com o ácido gálico ou com o benzonidazol (100 mg/kg),

mostrou ausência de infiltrado inflamatório e integridade do tecido cardíaco e muscular esquelético em 100% das amostras (Tabela 6, Figura 22A e C). De forma semelhante, a maioria dos camundongos tratados com o galato de dodecila isoladamente (71%) ou em combinação com o benzonidazol (83,3%) também não apresentou focos inflamatórios nas amostras analisadas (Tabela 6; Figura 22B e D). Embora quatro animais (28,6%) tratados com o galato de dodecila tenham apresentado inflamação, geralmente perivascular, o grau foi muito discreto, quando comparado com os animais não tratados (veículo) (Figura 22B e D). Este achado é intrigante, visto que, a despeito destes animais não terem sido curados, como comprovado pela hemocultura e PCR, apresentavam um menor grau ou até mesmo ausência de inflamação, sugerindo um possível papel imunomodulador ou anti-inflamatório dos galatos no curso da infecção murina pelo *T. cruzi*.

Tabela 5. Efeito do tratamento isolado e combinado do galato de dodecila e do benzonidazol sobre a sobrevivência e cura parasitológica de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Compostos	Após o tratamento				
	A fresco pos/total (%)	Mortalidade /total (%)	Hemocultura pos/total (%)	PCR pos/total (%)	Neg/total (%)
Ácido gálico	1/10 (10)	1/10 (10)	3/8 (37,5)	5/5 (100)	0/10 (0)
Galato de Dodecila	1/15 (6,7)	1/15 (6,7)	10/13 (76,9)	2/3 (66,6)	1/15 (6,6)
Galato de Dodecila + BZN	1/15 (6,7)	1/15 (6,7)	9/13 (69,2)	3/4 (75)	1/15 (6,6)
BZN 5 mg/kg	0/10 (0)	0/10 (0)	7/10 (70)	0/3 (0)	3/10 (30)
BZN 100 mg/kg	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	4/10 (40)	6/10 (60)
Veículo	3/10 (30)	2/10 (20)	6/7 (85,7)	1/1 (100)	0/10 (0)

BZN= benzonidazol; pos= positivos; neg= negativos.

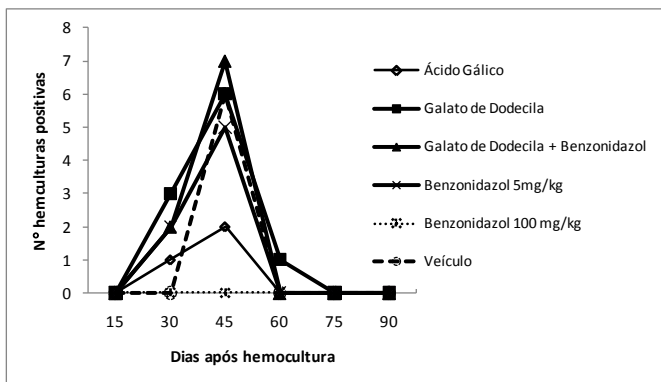


Figura 20. Perfil temporal da positividade de hemoculturas de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* realizadas 60 dias após o término do tratamento experimental.

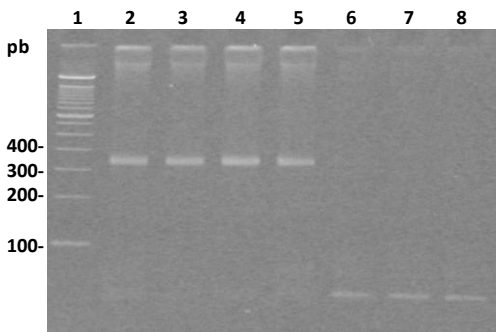


Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% representativa do produto de PCR de sangue periférico de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após tratamento experimental. 1- padrão de peso molecular; 2- controle positivo (DNA *T. cruzi*); 3 a 6- animais tratados com ácido gálico; galato de dodecila; galato de dodecila + benzonidazol; benzonidazol 100mg/kg, respectivamente; 7- controle negativo (*naive*); 8- controle negativo (água).

Tabela 6. Achados histopatológicos em cortes seriados de coração e músculo esquelético de camundongos cronicamente infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após tratamento experimental. Os resultados expressam o percentual de animais com ausência de inflamação (-), inflamação discreta (+) com característica focal (F) ou difusa (D)

Tratamento	Coração				Músculo				Nº total de animais
	-*	+*	F [#]	D [#]	-*	+*	F [#]	D [#]	
Ácido gálico	100	0	0	0	100	0	0	0	9
Galato de dodecila	71,4	28,6	100	0	64,3	35,7	100	0	14
Galato de dodecila + BZN	83,3	16,7	0	100	83,3	16,7	100	0	12
BZN 5 mg/kg	80	20	100	0	80	20	100	0	10
BZN 100 mg/kg	100	0	0	0	100	0	0	0	10
Veículo	12,5	87,5	14,3	85,7	50	50	25	75	8

BZN= benzonidazol

*Percentual em relação ao número total de animais do grupo

[#]Percentual em relação ao número de animais com inflamação.

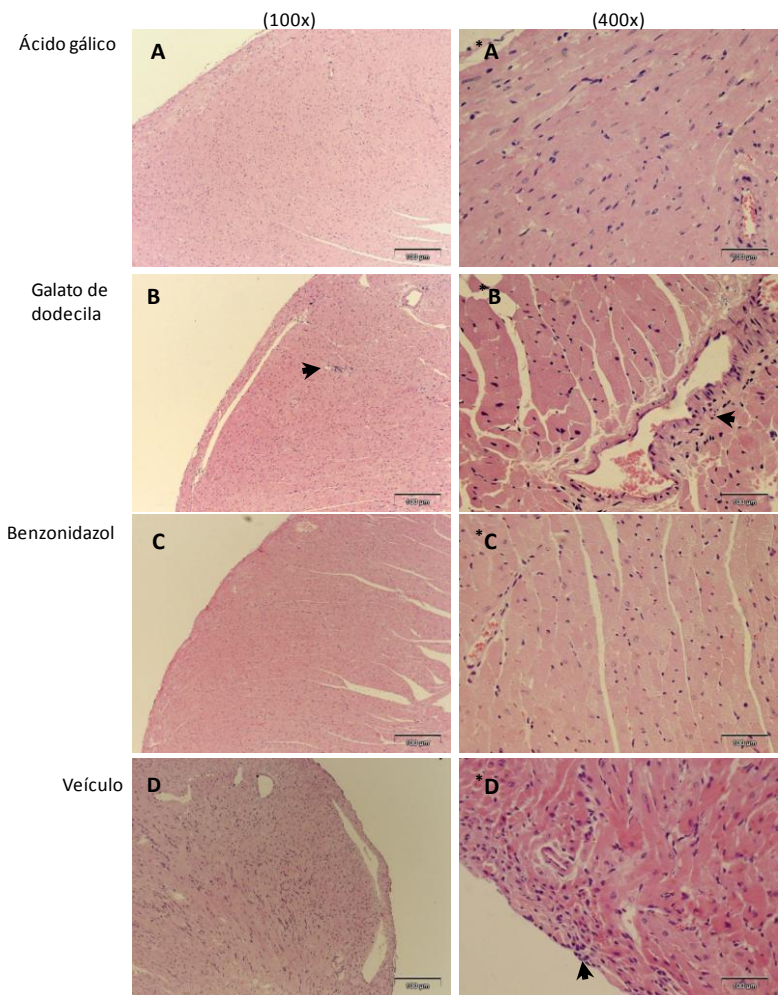


Figura 22. Corte histológico de tecido cardíaco de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* 60 dias após o término do tratamento experimental com (A) ácido gálico; (B) galato de dodecila; (C) benzonidazol; (D) veículo. A seta indica o infiltrado inflamatório. Coloração H&E, aumento 100x (A-D) ou 400x (*A-*D).

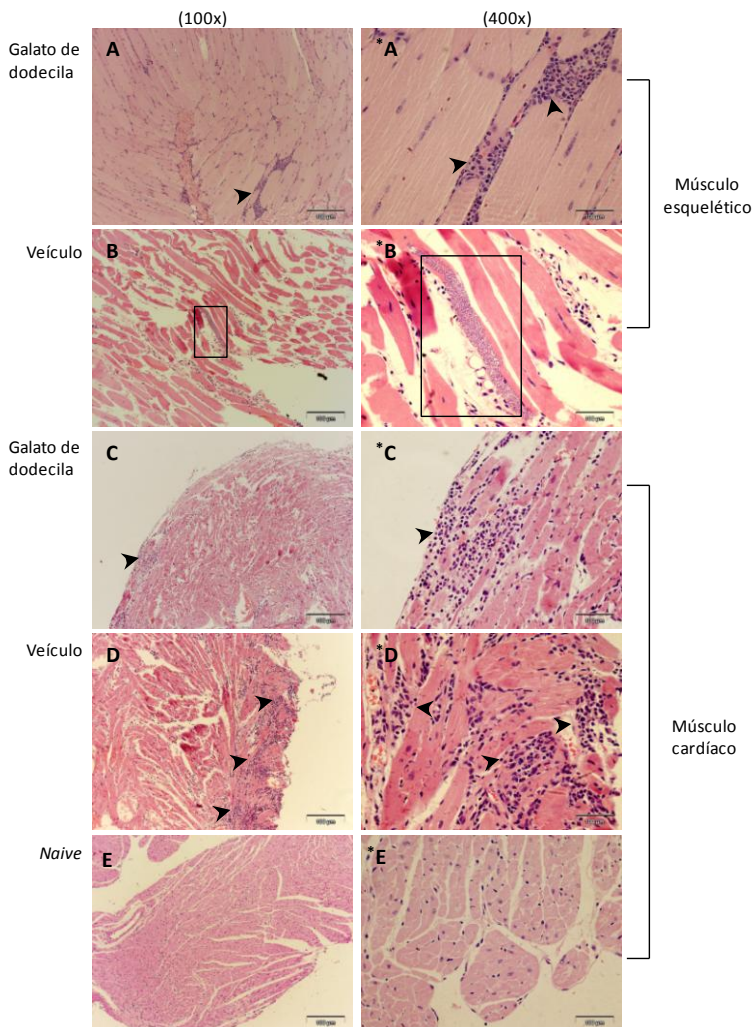


Figura 23. Corte histológico representativo de tecido muscular esquelético (A, B) e cardíaco (C-E) de camundongos Swiss após três meses de infecção com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento experimental com (A, C) galato de dodecila ou (B, D) veículo. (E) *naive*. A seta indica o infiltrado mononuclear/linfomononuclear e o retângulo destaca um ninho de amastigotas. Coloração H&E, aumento 100x (A-E) ou 400x (*A-*E).

5.8 Avaliação do potencial anti-inflamatório na infecção experimental pelo *T. cruzi*

O papel imunomodular e/ou anti-inflamatório dos galatos foi investigado no modelo murino frente à cepa Colombiana de *T. cruzi*, a qual é resistente ao benzonidazol e induz expressiva miocardite e miosite. Camundongos Swiss foram infectados com 1.000 tripomastigotas de cultura, sendo que a infecção foi confirmada pelo exame a fresco em todos os animais no 18º dia p.i. Após dois meses, grupos de oito camundongos receberam o galato de dodecila (50 mg/kg/dia) ou o veículo (DMSO 2,5% + trigliceril) por 21 dias consecutivos. Paralelamente, um grupo de animais não infectados e não tratados (*naive*) foi utilizado como controle adicional. Para a análise histopatológica e perfil de citocinas transcritas, três a quatro animais/grupo foram sacrificados antes, durante e no final do tratamento (cerca de três meses p.i).

As análises histopatológicas mostraram intensa inflamação em ambos os tecidos de ambos os grupos (Figura 23A-D), com uma discreta diminuição no grupo tratado com o galato de dodecila (Figura 23C). Foi observado um predomínio de infiltrado linfocítico com presença de macrófagos e plasmócitos, sugerindo infecção ativa, a qual foi confirmada pela visualização de amastigotas teciduais (Figura 23B) em ambos os grupos.

O perfil de citocinas transcritas no tecido cardíaco mostrou que a infecção induziu um aumento de IL-10, TNF e IFN- γ , quando comparado ao grupo *naive* (Figura 24). Embora os níveis de RNAm de IL-10 (anti-inflamatória) tenham permanecido elevados nos primeiros 10 dias de tratamento com o galato de dodecila, os mesmos igualaram-se ao grupo controle (veículo) no final. Os níveis de TNF (pró-inflamatória) não variaram entre os grupos experimentais. Por outro lado, camundongos tratados com o galato de dodecila apresentaram expressiva diminuição dos níveis de RNAm de IFN- γ (pró-inflamatória) ao final de 21 dias de tratamento. A estimativa da carga parasitária no tecido cardíaco dos animais através de qPCR não se mostrou adequada uma vez que animais com histopatológico positivo apresentaram resultado de qPCR negativo.

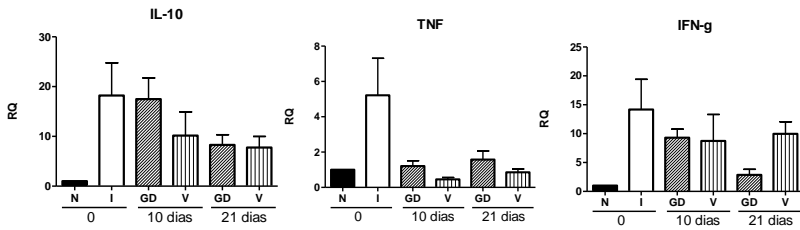


Figura 24. Perfil de transcrição gênica no tecido cardíaco de camundongos Swiss após três meses de infecção com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* ao longo de 21 dias de tratamento com o galato de dodecila (GD) ou veículo (V). Os valores expressam a média \pm SD da quantidade relativa (RQ) de RNAm das citocinas IL-10, TNF e IFN- γ detectados por RT-qPCR em relação ao grupo *naive* (N).

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas necessita urgentemente de mais opções de tratamento, visto que os dois fármacos de uso clínico (benzonidazol e o nifurtimox) foram introduzidos há mais de 40 anos e ambos têm falhado no controle da doença, apresentam limitada eficácia na fase crônica (apresentação mais frequente da doença), requerem longos períodos de tratamento (60 dias para o benzonidazol e 90 dias para o nifurtimox) e têm efeitos colaterais severos. Além disso, o nifurtimox também pode causar convulsões e outras desordens do sistema nervoso central (CLAYTON, 2010a). Somado a tudo isso, há também o fato de que muitas comunidades residentes em áreas rurais de países endêmicos não terem acesso à infraestrutura de suporte, que possa permitir ao paciente o tratamento completo, o que reduz ainda mais a eficácia do fármaco e pode induzir resistência.

Para a indústria farmacêutica, que é responsável pela maioria das pesquisas e desenvolvimento de fármacos, investir em novos medicamentos para o tratamento das doenças negligenciadas representa um elevado custo e risco. Tal argumento é sustentado pelo fato de que países desenvolvidos oferecem incentivos de mercado viáveis para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos destinados a outras doenças, tanto pelo mercado de compra individual quanto por programas estatais de saúde pública. Na Europa, por exemplo, esse mercado cobre dois terços dos custos dos medicamentos desenvolvidos para 80 a 100% da população, em contraste com 35% na América Latina e menos de 8% na África (BOUTAYEB, 2007). Em termos de valores, isso representa um gasto público com medicamentos em torno US\$ 239 per capita por ano nos países pertencentes à Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), sendo um forte incentivo para o desenvolvimento de medicamentos para este mercado. Contrariamente, a maioria dos países em desenvolvimento gasta menos de US\$ 20 per capita por ano (menos de US\$ 6 na África sub-Sahariana) em todos os programas de saúde (TROUILLER et al., 2002). Levando em consideração que de cada 10.000 moléculas farmacologicamente testadas, apenas uma chega às farmácias, demandando em média 12 anos de estudo e um investimento em torno de US\$ 800 milhões, o baixo gasto público com medicamentos para as doenças tropicais resulta em um mercado demasiadamente pequeno para atrair investimentos privados em pesquisa e desenvolvimento para estas doenças (HENRIQUES et al., 2005).

A Fundação Global de Inovação para Doenças Negligenciadas (G-FINDER), em um levantamento feito em 2009, mostra que dos US\$ 132 milhões gastos globalmente em 2008 com doenças causadas por parasitos da ordem Kinetoplastidae, somente US\$ 15,6 milhões foram destinados à pesquisa em doença de Chagas, sendo que a maioria deste investimento foi direcionada para a pesquisa básica, totalizando menos que US\$ 5 milhões para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, fármacos e vacinas (CLAYTON, 2010b).

Desta forma, a busca por moléculas eficazes no combate às doenças negligenciadas permanece, na maioria das vezes, no âmbito da pesquisa acadêmica, sendo que, frequentemente, o estudo encerra-se na pesquisa básica e não avança para os ensaios *in vivo* e clínicos.

No presente trabalho, foi avaliado o potencial terapêutico do ácido gálico e ésteres de galato para o tratamento da infecção experimental pelo *T. cruzi*. A base para este estudo foi o trabalho realizado anteriormente por Albino (2005), no qual foi investigado o efeito tripanocida *in vitro* de 28 polifenóis, sendo que os ésteres de galato mais ativos (contendo entre 8 a 14 carbonos) foram obtidos comercialmente e utilizados no presente estudo.

Inicialmente, foram conduzidos experimentos *in vitro* com formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares, ambas clinicamente relevantes por estarem presentes na infecção humana. Semelhante às observações de Albino (2005), os resultados do presente estudo mostraram que os ésteres de galato a 50 μ M causaram 45% a 60% de mortalidade em tripomastigotas sanguíneas (Tabela 1). Entretanto, nenhum dos compostos foi mais ativo do que o quimioprofilático violeta de genciana, o qual continua sendo, desde 1953, a única substância disponível para a esterilização de bolsas de sangue contaminadas pelo *T. cruzi*. Embora a violeta de genciana seja utilizada em baixas concentrações (0,6 nM/litro), eliminando totalmente o parasito após 24 horas de incubação a 4°C, seu uso tem a desvantagem de ocasionar coloração de pele e mucosa do indivíduo receptor e, ocasionalmente vômito e alterações gastrointestinais (CLAYTON, 2010a).

Desta forma, a busca por novas moléculas que possam ser utilizadas na prevenção da transmissão chagásica transfusional continua sendo relevante, sobretudo nos países que registram taxas de sorologias positivas para *T. cruzi* acima de 25% em doadores de sangue, assim como em regiões não endêmicas que recebem muitos imigrantes latinos (CAMARGO, 1992; SCHMUÑIS, 1999, 2007). Diversos compostos já

foram descritos na literatura como sendo potenciais quimioprolifáticos, entre eles o antibiótico anfotericina B (CRUZ et al., 1980), a aminoquinolina WR6026 (CHIARI et al., 1996; MORAES-SOUZA et al., 2002) e, mais recentemente, a arilimidamida DB766 (BATISTA et al., 2010). Embora muitas moléculas efetivas contra as fomas tripomastigotas tenham sido descritas na literatura, o uso delas como quimioprolifático é, na maioria das vezes, inviável por diversas razões, tais como: inatividade a 4°C (temperatura requerida para a preservação das bolsas de sangue), indução de hemólise, interferência com componentes sanguíneos (eletrólitos, como Na e K, gases), indução de efeitos colaterais, entre outros.

Os resultados do presente estudo mostraram que os ésteres de galato, principalmente o galato de dodecila, são mais potentes contra formas amastigotas intracelulares do que contra formas flageladas extracelulares. Embora não tenha sido realizado nenhum estudo para verificar o mecanismo de interiorização celular dos ésteres de galato, é possível supor que as diferenças bioquímicas das membranas celulares do parasito e da célula hospedeira, ou os mecanismos distintos de captação e/ou metabolização podem estar envolvidos na biodisponibilidade destes compostos nos modelos *in vitro* e, conseqüentemente interferindo em sua atividade biológica. A presença e o tamanho da cadeia alquílica no ácido gálico está relacionada com características de lipossolubilidade e, conseqüentemente pode conferir diferentes graus de permeabilidade celular. Masaki e colaboradores (1997) observaram que ésteres de galato protegem as células fibroblásticas da derme dos danos provocados pelos radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, sendo que este efeito protetor depende do tamanho da cadeia carbônica. Por outro lado, Kubo e colaboradores (2002a), ao testarem uma série de ésteres de galato sintéticos (galatos de hexila, heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila e tridecila) contra *Salmonella choleraesuis*, em um modelo completamente diferente do trabalho anterior, não observaram correlação entre o tamanho da cadeia alquílica e a atividade antibacteriana dos compostos. Entre 13 ésteres de galato avaliados por Albino (2005), seis deles (contendo cadeia alquílica variando de 6 a 14 carbonos) foram ativos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo que os galatos com menos de 10 carbonos não foram capazes de inibir a proliferação de amastigotas intracelulares em células Vero, sugerindo uma maior dificuldade de permeação destes ésteres na célula hospedeira.

Kolodziej e colaboradores (2001) ao avaliarem a atividade leishmanicida *in vitro* de diferentes taninos hidrolizáveis, observaram que nenhum dos polifenóis avaliados foi significativamente tóxico para formas extracelulares (promastigotas), mas apresentaram uma pronunciada atividade ($CI_{50} < 0,4-12,5 \mu\text{g/ml}$) contra formas amastigotas de *L. major* em células RAW. Os autores também investigaram a ativação de vias microbicidas como NO, IFN- γ e TNF- α e encontraram uma correlação positiva entre a ativação do macrófago e a atividade antiparasitária para os elagitaninos, assim como para o ácido gálico e o galato de metila. Desta forma, os autores sugeriram que a maior atividade contra as formas intracelulares de *L. major* poderia estar relacionada à ativação destas vias microbicidas por estes compostos. Kiderlen e colaboradores (2001) ao avaliarem a atividade leishmanicida de polifenóis em macrófagos murinos derivados de medula óssea, mostraram que estes compostos foram capazes de induzir moderada produção de NO (7-54 μM). Entretanto, esses mesmos autores mostraram que a inibição da NO sintase não alterou a atividade leishmanicida intracelular destes polifenóis. No presente estudo, apesar da significativa atividade tripanocida dos galatos de decila e dodecila (Tabela 3), não foi detectada a produção de NO nos sobrenadantes das culturas de macrófagos murinos derivados de medula óssea. Em conjunto, estes resultados sugerem que a ação leishmanicida e tripanocida destes compostos independe do efeito adicional da via microbicida mediada por NO em macrófagos.

Ferreira e colaboradores (1988) ao testarem o efeito tripanocida de alguns compostos fenólicos, observaram uma correlação positiva entre inibição da cadeia respiratória e redução da proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Tulahuen, Y e o clone Dm28c), assim como para formas procíclicas e tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei brucei*. Os autores sugeriram que alguns compostos fenólicos, inclusive os galatos de metila e propila, podem interromper o transporte de elétrons mediado por ubiquinona/ubiquinol, mimetizando a coenzima-Q, cujo mecanismo de ação foi proposto anteriormente por Grady e colaboradores (1986) para *T. brucei*. Entretanto, nos estudos de Albino (2005), estes mesmos galatos não foram ativos contra formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

A privação de oxigênio leva a uma inabilidade de produzir energia a partir da cadeia de transporte de elétrons, resultando no aumento da permeabilidade da membrana e edemaciamento mitocondrial. O edema mitocondrial é um elemento chave na patogênese

de lesão irreversível da célula levando à morte celular por lise (SMITH et al., 2007). No presente estudo, o envolvimento da cadeia respiratória na toxicidade *in vitro* do *T. cruzi* pelos ésteres de galato não foi avaliada. Entretanto, a análise ultraestrutural mostrou que o galato de dodecila ocasionou edemaciamento da mitocôndria e lise celular (Figuras 11D, 12D). Embora estes efeitos possam ser consequência de diversos outros alvos de ação, estes resultados, em conjunto com os dados da literatura, sugerem que o bloqueio da cadeia respiratória precisa ser melhor investigado como um possível mecanismo de ação na atividade tripanocida dos ésteres de galato.

Diferentes abordagens têm sido empregadas na investigação do mecanismo de ação e na descoberta de alvos específicos para o desenvolvimento de fármacos para a doença de Chagas. Neste contexto, a microscopia eletrônica vem se estabelecendo como uma importante ferramenta, cujas análises de modificações ultraestruturais podem apontar importantes alvos contra organelas ou vias metabólicas e, até mesmo, elucidar ou dar indícios do mecanismo de ação envolvido em compostos ativos contra o *T. cruzi* (RODRIGUES; DE SOUZA, 2008; MENNA-BARRETO et al., 2009; VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009).

Os tripanosomatídeos apresentam uma única mitocôndria, que se estende por todo o corpo do protozoário, ocupando aproximadamente 12% do volume celular. O DNA mitocondrial se organiza em maxi e minicírculos, que se concentram logo abaixo da região do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura denominada de cinetoplasto. Na presença de compostos intercalantes de DNA, como a acriflavina e o brometo de etídeo, observa-se uma dispersão do DNA mitocondrial por toda a organela e, portanto, o cinetoplasto não é visualizado (DE SOUZA, 2000). Sendo assim, a manutenção da integridade do cinetoplasto, apesar do intumescimento da mitocôndria, observada no presente estudo, sugere que o mecanismo de ação tripanocida do galato de dodecila seja distinto daquele dos intercalantes de DNA.

Além do impacto sobre a mitocôndria, também foi observada uma expressiva diminuição no número e na densidade dos reservossomos em epimastigotas tratados, em comparação ao controle não tratado. Os reservossomos, presentes exclusivamente em epimastigotas, são compartimentos pré-lisossomais com função de acumular macromoléculas, como lipídeos e proteínas, ingeridas por endocitose (SOARES, 1999). Quando os parasitos são incubados em um meio de cultura pobre em nutrientes, os reservossomos desaparecem gradualmente, desencadeando o processo de transformação de formas

epimastigotas em tripomastigotas infectivos e não proliferativos (SOARES, 1999). Portanto, a diminuição da densidade e/ou do número destas organelas pode ser correlacionada com a depleção do estoque de macromoléculas exógenas ou, ainda, com a diminuição no metabolismo de biossíntese de lipídeos e proteínas (CUNHA-SILVA et al., 2002). No presente estudo, além das alterações nos reservossomos, foram observadas alterações na fluidez da membrana, levando ao esvaziamento do citoplasma e da mitocôndria, eventos estes que precederam a total lise celular. Observações semelhantes foram descritas por Dantas e colaboradores (2006) ao avaliarem a atividade tripanocida do própolis, rico em compostos fenólicos, e os autores sugeriram o comprometimento da biossíntese de lipídeos como possível causa destas mudanças estruturais. Alterações semelhantes foram relatadas nos estudos com inibidores da biossíntese do ergosterol, tais como o cetoconazol, itraconazol e posaconazol (LAZARDI et al., 1990; URBINA et al., 1988a,b;1991; DOCAMPO; SCHMUÑIS, 1997). Estes dados, somados ao fato de alguns ésteres de galato, sobretudo o galato de dodecila, serem potentes inibidores da squaleno epoxidase, enzima envolvida na via metabólica do esterol (ABE et al., 2000) sugerem a necessidade de maiores estudos para avaliar uma possível interferência dos galatos na biogênese de ergosterol em *T. cruzi*

Além da via de biossíntese do ergosterol, outros alvos também podem estar envolvidos e precisam ser investigados. Em um dos poucos estudos sobre a atividade antiparasitária do ácido gálico, Nose e colaboradores (1998) sugeriram que o mecanismo envolvido na destruição *in vitro* de formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* é a formação de intermediários reativos de oxigênio (ROIs). Além disso, o ácido gálico e seus ésteres possuem uma fração pirogalol, cuja capacidade de produzir ROIs por auto-oxidação já foi descrita (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

A proteção contra o estresse oxidativo em tripanosomatídeos é majoritariamente realizada pelas reações de oxirredução da TR, a qual está localizada principalmente no citoplasma e na mitocôndria do parasito (MEZIANE-CHERIF et al., 1994). Por ser um alvo validado para o desenho racional de moléculas ativas contra tripanosomatídeos, diversos inibidores reversíveis e irreversíveis da TR já foram descritos. Em uma ampla revisão, Duschak e Couto (2007) destacaram alguns compostos tricíclicos (como a clomipramina), alguns derivados de poliaminas, quinolinas e nitrofuranos, bem como algumas nitrosouréias e aminodifenilsulfetos como importantes inibidores da TR. A

identificação de inibidores da TR, realizada por Inhoff e colaboradores (2002) geraram uma patente (WO0050431A1, 2000) para os compostos 9-aminoacridina e terpiridina.

Com o propósito de avaliar o efeito inibitório dos galatos sobre esta enzima chave, o gene completo da TR de *T. cruzi* foi clonado e expresso em *E. coli* como uma proteína solúvel e ativa. Nossos resultados mostram que, a despeito da expressiva atividade tripanocida *in vitro* dos ésteres de galato, estes compostos não inibiram de forma seletiva a TcTR. Contrariamente, o ácido gálico, inativo contra o parasito, apresentou uma significativa inibição da enzima recombinante ($CI_{50} = 45,6 \mu\text{M}$) semelhante ao controle clomipramina ($CI_{50} = 63,6 \mu\text{M}$) nas condições experimentais testadas. A clomipramina, um antidepressivo tricíclico, é classicamente utilizada como controle nos ensaios de inibição enzimática da TR, cuja CI_{50} varia entre 6,15 a 12,5 μM (BONNET et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, no presente estudo o efeito inibitório da clomipramina somente foi observado em concentrações mais elevadas (Figura 16A).

O efeito inibitório do ácido gálico foi seletivo para a TcTR, em comparação com a GR, enzima de função semelhante em mamíferos (Figura 17). Embora a GR utilizada em nosso estudo seja proveniente de *S. cerevisiae*, a comparação com a GR humana, com base no programa BLASTp, mostrou que elas apresentam 64% de similaridade entre si, sendo que a porção N-terminal da GR humana possui uma adição de 63 aminoácidos, o que confere a maior diferença entre elas. Como esta sequência polipeptídica não está relacionada à atividade enzimática é plausível supor que o ácido gálico também não interfira na atividade da GR humana.

Desde que a TR foi descrita e apontada como um importante alvo terapêutico, um considerável número de artigos científicos discute a correlação entre os inibidores *in vitro* da TR com a atividade antiparasitária. A avaliação do efeito tripanocida da clomipramina mostrou atividade *in vitro* (DE BARIOGLIO et al., 1987) e *in vivo* (RIVAROLA et al., 2001) contra a cepa Tulahuen, assim como efeito supressor da parasitemia, da lesão cardíaca e das taxas de mortalidade em camundongos infectados com uma cepa recém isolada de um paciente da Argentina (RIVAROLA et al., 2005). Por outro lado, Girault e colaboradores (2001) mostraram que diferentes aminodifenilsulfetos foram potentes inibidores da TR ($CI_{50} = 0,25$ a $0,75 \mu\text{M}$), mas não observaram uma correlação entre o efeito inibitório da TR com a

atividade antiparasitária *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. infantum* e tripomastigotas sanguíneos de *T. brucei*.

Portanto, o uso destes inibidores em ensaios *in vitro* e *in vivo* contra diferentes tripanosomoatídeos patogênicos tem apresentado resultados controversos e, em geral, acabam apontando uma baixa ou até a ausência de correlação tangível entre os ensaios de inibição enzimática x biológicos. No presente estudo, o composto com o maior potencial inibitório da TcTR foi o ácido gálico, o qual não apresentou atividade tripanocida *in vitro* em nenhuma das concentrações testadas. A ausência desta bioatividade do ácido gálico pode ser devida, em parte, à sua baixa permeabilidade celular, sendo que a esterificação do ácido gálico é amplamente descrita como uma importante forma de aumentar a lipofilicidade e consequentemente, sua bioatividade. Desta forma, o efeito tripanocida dos ésteres de galato poderia estar relacionado com a maior permeação destes compostos no ambiente intracelular. Uma vez interiorizados, estes ésteres podem ser hidrolisados e o ácido gálico livre desempenhar seu papel tripanocida.

A biodisponibilidade dos compostos e o acesso ao alvo terapêutico são normalmente apontados como a causa da falta de correlação entre inibição enzimática *in vitro* e atividade biológica (IRIGOÍN et al., 2008). Há também a questão da abundância da enzima-alvo, o que pode requerer a manutenção de altas concentrações do composto no ambiente intracelular, tanto de inibidores reversíveis quanto irreversíveis, visto que o inibidor precisa superar uma rápida síntese *de novo* da enzima-alvo (DUSCHAK; COUTO, 2007). Particularmente no caso da TR, estudos de deleção gênica em *T. brucei* revelaram que a manutenção de 10% da atividade da TR é suficiente para manter a viabilidade deste parasito, indicando que níveis baixos da enzima são suficientes para manter a tripanotona em seu estado reduzido, em meios de cultivo convencionalmente utilizados (KRIEGER et al., 2000). Desta forma, os problemas de biodisponibilidade dos compostos, somados ao fato da atividade da TR ter que ser reduzida em mais de 90%, podem ser a razão para a baixa eficácia demonstrada pelos inibidores desta enzima na maioria dos ensaios biológicos.

Neste estudo, nos ensaios de atividade tripanocida contra formas intracelulares em células Vero, observou-se que todos os ésteres de galato foram mais ativos do que o benzonidazol contra ambas as cepas (Figura 6, Tabela 2), sendo que a cepa Colombiana (resistente ao benzonidazol *in vivo*), foi cerca de quatro vezes mais sensível do que a cepa Y (Tabela 2, Figura 6). Este resultado está de acordo com as

observações anteriormente feitas por Neal e van Bueren (1988) e refletem a falta de correlação entre a suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* a diferentes compostos, inclusive aos fármacos benzonidazol e nifurtimox, apresentada por diferentes cepas de *T. cruzi* (BRENER et al., 1976; FILARDI; BRENER, 1987; MURTA et al., 1998).

A atividade tripanocida contra formas amastigotas da cepa Y em células Vero pelo galato de dodecila ($CI_{50} < 1\mu M$) foi pelo menos 11 vezes maior que a observada para o benzonidazol ($CI_{50} = 11,4 \mu M$). Embora as células da linhagem Vero sejam amplamente utilizadas nos ensaios de atividade tripanocida, este modelo nem sempre é totalmente adequado, pois a proliferação celular que ocorre durante o ensaio pode levar a valores subestimados da taxa de infecção, sobretudo quando um baixo número de células é avaliado. Além disso, as células e os parasitos não se distribuem de forma homogênea nos poços das placas de cultura. Desta forma, 200 células podem ser contadas em dois ou três campos microscópicos, acarretando em uma baixa representatividade da amostra. Por esta razão, as análises do presente estudo envolveram cerca de 90% da totalidade da monocamada celular.

Como células do sistema monofagocítico apresentam baixa replicação celular *in vitro* e são hospedeiras naturais de vários patógenos, incluindo *T. cruzi* e *Leishmania* spp., macrófagos peritoneais de camundongos também são amplamente utilizados nos ensaios de atividade antiparasitária. Entretanto, a obtenção e o rendimento destas células são fatores limitantes para seu uso frequente, levantando uma série de questionamentos éticos. Desta forma, foi padronizado no laboratório o cultivo de macrófagos murinos da linhagem BALB/c obtidos de medula óssea como modelo para testes antiparasitários. Estas células podem ser criopreservados e geram um rendimento aproximado de três a quatro placas de 96 poços por animal. Este modelo também pode trazer informações sobre a capacidade do composto de chegar, em níveis adequados, ao vacúolo parasitóforo, mantendo seu efeito antiparasitário, bem como potenciais efeitos do composto sobre as células, ativando ou inibindo vias microbicidas, tais como produção de radicais livres e citocinas TNF e IFN- γ (PANARO et al., 2001; CALLA-MAGARINOS et al., 2009; FORTÉA et al., 2009). No presente estudo, utilizando o modelo de macrófagos murinos derivados de medula óssea, foi observado que os galatos de decila e dodecila a $2 \mu M$ inibiram aproximadamente 80% da proliferação de amastigotas, enquanto que o benzonidazol se mostrou inativo nesta concentração (Tabela 3). Além disso, a dosagem de NO no sobrenadante destas culturas mostrou que os

galatos não ativaram a via microbicida do NO, sugerindo que a atividade tripanocida foi independente desta via.

A sinergia entre fármacos pode ser uma ferramenta valiosa para melhorar a eficácia do tratamento. Um dos exemplos mais contundentes é a terapia antiretroviral largamente usada por pacientes HIV positivos, a HAART (do inglês *highly active antiretroviral treatment*). A baixa eficácia e os significativos efeitos colaterais dos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, assim como a falta de perspectivas para a instituição de um novo fármaco tem despertado o interesse para as pesquisas de terapias combinadas (COURA, 2009). Já foi demonstrado que a combinação do benzonidazol com cetoconazol induziu um efeito sinérgico no tratamento de camundongos infectados com as cepas CL e Y de *T. cruzi* (ARAÚJO et al., 2000). Mais recentemente, foi demonstrado um efeito sinérgico *in vitro* e *in vivo* no tratamento combinado do antirrítmico amiodarona e o posaconazol (BENAIM et al., 2006). No presente estudo, a avaliação do tratamento combinado do benzonidazol com o galato de dodecila *in vitro* sobre formas amastigotas intracelulares, mostrou um efeito aditivo na atividade tripanocida (Figuras 9, 10).

Sendo assim, a potente atividade inibitória *in vitro* dos galatos, comprovada em dois modelos celulares distintos, as evidências de uma ação direta sobre os parasitos, a baixa toxicidade relatada para estes compostos em outros modelos farmacológicos murinos (OW; STUPANS, 2003; HSU; YEN, 2007) e a total carência de dados sobre a atividade tripanocida *in vivo* destes compostos, levaram à continuidade do estudo para a investigação de seu potencial antiparasitário no modelo murino da infecção pelo *T. cruzi*.

Inicialmente, a avaliação da atividade tripanocida na fase aguda foi realizada segundo o método de triagem de compostos ativos *in vivo*, descrito por Filardi e Brener (1984). Este método consiste em avaliar a rápida diminuição da parasitemia 6 e 24 horas após um tratamento agudo em dose única e alta (500 mg/kg). A administração por via oral mostrou, contrariamente ao benzonidazol, que nenhum dos galatos foi capaz de controlar a parasitemia e a mortalidade (Figura 18, Tabela 4).

Embora a correspondência entre os resultados obtidos com este método rápido de triagem e o método de tratamento convencional de longa duração seja aceitável, algumas discrepâncias podem surgir. Um exemplo é o da cepa Colombiana, cuja redução da parasitemia é significativamente alta após tratamento rápido com benzonidazol, mas contrasta com a baixa percentagem de cura no tratamento prolongado

com esse fármaco. O método rápido também não pode ser aplicado nos testes com os inibidores da síntese de ergosterol, pois a depleção desse esteróide ocorre lentamente e o efeito sobre os parasitos só é detectado em tempos mais tardios de tratamento (BRENER, 2000).

Face ao relato do envolvimento de alguns ésteres de galato na inibição da squaleno epoxidase, enzima envolvida na via metabólica de esterol (ABE et al., 2000), somado às alterações ultraestruturais (Figuras 11, 12) induzidas pelo galato de dodecila em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares, serem semelhantes a outros inibidores da via, nos motivaram a avaliar o efeito dos galatos em esquemas de administração mais prolongados.

As doses dos ésteres de galato administrados por via oral ou i.p. em diversos modelos murinos é extremamente variável (2 a 500 mg/kg/dia), conforme revisto por Ow e Stupans (2003). A avaliação da toxicidade em ratos de diferentes ésteres de galato administrados por via oral mostrou que os valores de DL₅₀ variaram de 2,0-3,8 g/kg para o galato de propila, de 1,96-4,7 g/kg para o galato de octila e de 6,5 g/kg para o galato de dodecila (FAO/WHO, 1974). Cabe salientar, que todos estes compostos são largamente utilizados como antioxidantes em alimentos e, portanto, fazem parte da dieta alimentar de humanos. Estudos preliminares realizados no Laboratório de Fisiologia da UFSC para a avaliação do efeito analgésico de ésteres de galato no modelo murino mostraram que a administração de doses de 50 mg/kg por via i.p. e 500 mg/kg por via oral foram efetivas quanto ao seu efeito analgésico e não ocasionaram efeitos tóxicos e/ou mortalidade nos grupos experimentais (SANTOS, 2004 comunicação pessoal). Entretanto, no modelo murino da infecção pelo *T. cruzi*, observou-se que a via i.p. foi extremamente tóxica, causando a morte dos animais em períodos de 6 a 24 horas após a administração (dados não mostrados). A via oral foi melhor tolerada pelos animais, mas a dose de 500 mg/kg causou um efeito imediato de apatia que perdurou por cerca de 24 a 48 horas, mostrando que esta dose não é adequada para um tratamento mais prolongado. Curiosamente, neste estudo camundongos sadios tratados paralelamente ao grupo de animais infectados pelo *T. cruzi*, submetidos ao mesmo esquema terapêutico, não apresentaram nenhuma evidência aparente de toxicidade e sobreviveram por períodos superiores a 60 dias após o tratamento (dados não mostrados).

Güida e colaboradores (2007), ao avaliarem o efeito antiproliferativo de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) *in vitro* e *in vivo*, mostraram que a administração de 0,8 mg/kg/dia via i.p. do galato de

epigallocatequina (EGCg), extraído do chá verde de *Camellia sinensis*, reduziu a parasitemia em 50% e elevou a taxa de sobrevivência de 11% para 60% em camundongos tratados por 45 dias. Nos ensaios toxicológicos, os mesmos autores mostraram, através da análise histopatológica do fígado, que a administração de 16,3 mg/kg/ de EGCg causou injúria celular em hepatócitos, caracterizada por citoplasma vacuolizado e presença de núcleo picnótico. Entretanto, nenhuma injúria hepática foi observada em camundongos sacrificados 30 dias após o tratamento, mostrando uma forte capacidade regenerativa do fígado, sendo que os efeitos tóxicos causados pelo tratamento podem ser reversíveis, sobretudo em tratamentos prolongados (GÜIDA et al., 2007). Desta forma, o possível efeito hepatotóxico de diferentes derivados do ácido gálico, somado à sobrecarga do fígado na infecção pelo *T. cruzi*, na qual ocorre uma marcante hepatoesplenomegalia, podem ter relação com a maior vulnerabilidade a efeitos colaterais, sobretudo em doses elevadas, nos animais infectados. Diante disto, a dose de 50 mg/kg/dia pela via oral foi adotada nos ensaios de atividade tripanocida *in vivo* e nenhum efeito tóxico aparente foi observado. Além disso, a análise histopatológica do fígado após um intervalo de 60 dias pós-tratamento não revelou nenhuma anormalidade.

No modelo agudo da infecção murina pelo *T. cruzi*, nenhum dos galatos testados foi capaz de suprimir a parasitemia e a mortalidade (Figura 19, Tabela 4), sendo que o curso da infecção patente foi semelhante em todos os animais, com pico máximo de parasitemia no 7º dia após a infecção, tipicamente descrito para a cepa Y de *T. cruzi* (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953). Estes resultados demonstram claramente que o tratamento com os galatos não modificou a evolução natural da infecção pelo *T. cruzi*.

Compostos fenólicos são altamente instáveis em solução e a forma de estocá-los pode contribuir para alterações de sua bioatividade (SRIVASTAVA et al., 2007). Durante todo o estudo, os compostos foram solubilizados na hora do uso e mantidos a -20°C, ao abrigo da luz, por uma a três semanas, no máximo. Além disso, após o término do tratamento *in vivo*, os compostos utilizados foram testados contra formas epimastigotas de *T. cruzi* para verificar a manutenção da atividade tripanocida. Todos os compostos testados apresentaram CI₅₀ semelhante àquela anteriormente estabelecida, mostrando que a ineficácia do tratamento *in vivo* não foi devido à degradação dos compostos em solução (dados não mostrados).

No modelo crônico da infecção murina pela cepa Y de *T. cruzi*, todos os animais completaram os 28 dias de tratamento, corroborando com os baixos efeitos tóxicos já descritos para os galatos. Entretanto, no tratamento experimental com os dois compostos testados (ácido gálico ou galato de dodecila) foram observados baixos índices de cura parasitológica, quando comparado com o tratamento convencional com o benzonidazol (Tabela 5). A definição de um rigoroso critério de cura no modelo crônico é fundamental, visto que o número de parasitos circulantes cai drasticamente e, conseqüentemente, afeta a sensibilidade dos testes parasitológicos, tanto os diretos (exame a fresco) como os indiretos (hemocultura e xenodiagnóstico). Os métodos sorológicos também não são adequados, pois os títulos de anticorpos diminuem naturalmente com a cronificação da infecção e persistem por meses em camundongos tratados com sucesso. Além disso, há algumas evidências sugerindo que a heterogeneidade genotípica das diferentes cepas de *T. cruzi* também pode influenciar na positividade das hemoculturas (MARTINS et al., 2008). Neste sentido, a PCR de sangue circulante e/ou de tecido vem se estabelecendo como um método sensível e confiável, capaz de mostrar a persistência de uma infecção residual, sendo considerada uma ferramenta importante para monitorar a eficácia de tratamentos experimentais murinos, assim como o tratamento convencional de pacientes (MARTINS et al., 2008; MIYAMOTO et al., 2008; BRITTO, 2009).

Embora a investigação *in vivo* de novos compostos com atividade tripanocida tenha gerado um considerável número de publicações, a diversidade de cepas e linhagens murinas, assim como de exames utilizados para monitorar a eficácia, inviabilizam a comparação dos dados. Desta forma, a falta de uma definição clara de critérios de cura, somada à grande heterogeneidade das cepas de *T. cruzi*, com características biológicas, imunológicas, bioquímicas e farmacológicas distintas, representam um grande gargalo para a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Diante disto, a partir de 2008 uma iniciativa multidisciplinar da Fiocruz em conjunto com a TDR iniciou a elaboração de um protocolo padronizado para a investigação *in vitro* e *in vivo* de moléculas ativas contra o *T. cruzi*, cujo resultado foi publicado no corrente ano, trazendo uma proposta clara dos modelos e critérios de eficácia a serem adotados nos ensaios *in vitro* e *in vivo* (ROMANHA et al., 2010).

Em virtude do efeito aditivo *in vitro* observado no tratamento combinado do benzonidazol e galato de dodecila, foi investigado se este

uso simultâneo poderia diminuir drasticamente a dose do benzonidazol no modelo murino. Desta forma, um grupo experimental recebeu o galato de dodecila e o benzonidazol em doses 20 vezes menores (5 mg/kg). A despeito do efeito aditivo *in vitro*, o tratamento combinado não foi eficaz *in vivo*, sendo que camundongos tratados com benzonidazol isoladamente apresentaram melhores índices de “cura” (30%) do que em combinação com o galato de dodecila (6,6%). Embora a administração do galato de dodecila ou do ácido gálico não tenha sido capaz de eliminar o *T. cruzi*, conforme evidenciado por hemocultura, PCR e reagudização pós-imunossupressão com ciclofosfamida (Tabela 5), as análises histopatológicas do coração e músculo esquelético mostraram que houve uma expressiva diminuição do processo inflamatório na maioria dos animais tratados, em comparação com o grupo não tratado (Tabela 6, Figura 22). Análises histopatológicas de tecido cardíaco mostraram que camundongos submetidos ao tratamento combinado apresentaram um padrão de inflamação difuso, contrastando com o padrão de inflamação focal no tratamento isolado com ambos os compostos.

A despeito de toda a discussão sobre o papel da autoimunidade no desencadeamento da inflamação, o uso de métodos mais sensíveis tem mostrado que a presença do parasito no tecido cardíaco tem um papel crítico para a manutenção do processo inflamatório (JONES et al., 1993). Embora o parasito não tenha sido visualizado nos cortes histológicos, os exames parasitológicos são prova irrefutável da infecção ativa nestes animais, sendo que a PCR quantitativa poderia trazer maiores informações sobre a carga parasitária tecidual. Desta forma, a expressiva diminuição do processo inflamatório nos animais tratados, a despeito da infecção ativa, sugere um papel antiinflamatório ou imunomodulador do galato de dodecila.

É bem conhecido que macrófagos e cardiomiócitos podem produzir e responder a diferentes quimiocinas após a infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, algumas quimiocinas facilitam a produção de TNF- α por macrófagos infectados e agem sinergicamente com IFN- γ para mediar a destruição do parasito (ALIBERTI et al., 2001). Além de modular a produção de citocinas, as quimiocinas são efetivas moduladoras do tráfego de células dendríticas e linfócitos (MOSER; LOETSCHER, 2001), influenciando na produção de uma resposta imune efetiva contra a invasão do parasito nos eventos iniciais da infecção. Por outro lado, a produção de quimiocinas também é modulada por IFN- γ e vice-versa, o que pode influenciar no recrutamento de células T-helper e

na produção local de IFN- γ , resultando na definição do infiltrado inflamatório, observado tanto no modelo experimental como em pacientes chagásicos (TEIXEIRA et al., 2002). Resultados descritos por Dos Santos e colaboradores (2001) em camundongos da linhagem C3H/HeJ infectados com a cepa Colombiana são consistentes com a importância do IFN- γ na elicitação de um ambiente favorável para a migração de leucócitos e desencadeamento de miocardite.

Baseado no conhecimento prévio sobre a relação entre infecção de *T. cruzi* com citocinas regulatórias pró e anti-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-10), envolvidas no controle parasitário e recrutamento de leucócitos teciduais, avaliou-se o papel do galato de dodecila na alteração deste padrão no modelo experimental murino com a cepa Colombiana. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tratamento com o galato de dodecila não alterou significativamente os níveis transcritos de IL-10 e TNF no coração, mas reduziu cerca de três vezes os níveis transcritos de IFN- γ em relação ao grupo não tratado (veículo). De Paula Costa e colaboradores (2010), ao avaliarem o efeito do enalapril na fase aguda da infecção de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana, observaram uma redução nos níveis séricos de TNF- α e IFN- γ , sem alterar os níveis de IL-10. Os autores sugeriram que esta mudança no perfil de citocinas refletiu na redução do infiltrado mononuclear no coração. Nas análises histológicas realizadas no presente estudo, não foi observada uma redução expressiva na inflamação, apesar dos níveis diminuídos de IFN- γ . A divergência entre tais resultados e os de De Paula Costa e colaboradores poderia estar relacionada a fatores, como a linhagem murina e o inóculo utilizado (50 tripomastigotas). Além disso, os autores iniciaram o tratamento concomitante com a infecção, antes mesmo do estabelecimento da inflamação. Em contraste, no presente estudo foi aplicado um inóculo de 10^3 tripomastigotas e o tratamento foi iniciado dois meses após a infecção, fase em que o influxo de células inflamatórias já foi desencadeado. Os resultados aqui obtidos mostram que, a despeito do infiltrado inflamatório, o galato de dodecila alterou o perfil de transcrição de citocinas produzidas no tecido cardíaco, sendo que o seu impacto na prevenção dos danos cardíacos em longo prazo precisa ser melhor investigado.

Embora a eficácia de um tratamento possa ser influenciada por diversos fatores, a resposta imunológica parece desempenhar um papel crucial. O efeito cooperativo entre o quimioterápico e o sistema imune do hospedeiro já foi descrito em diversos modelos experimentais:

doença de Chagas murina (TARGETT, 1985; OLIVIERI et al., 2006; FERRAZ et al., 2008), esquistossomose murina (DOENHOFF et al., 1987), leishmaniose visceral canina (RODRIGUEZ et al., 1981), entre outros. Para a doença de Chagas, já foi demonstrado que a eficácia do tratamento experimental do benzonidazol foi diminuída em camundongos nocaute para IFN- γ e IL-12 (ROMANHA et al., 2002). Além disso, pacientes curados após o tratamento com benzonidazol ou nifurtimox apresentaram maiores níveis séricos de IFN- γ do que aqueles pacientes tratados e não curados (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000). No presente estudo, não foram observadas diferenças significantes nas taxas de negatificação dos exames parasitológicos em animais tratados isoladamente com o galato de dodecila ou com benzonidazol a 5 mg/kg quando comparado aos que receberam o esquema combinado de ambos os compostos (Tabela 5), sendo que, o impacto da diminuição dos níveis transcricionais de IFN- γ sobre a carga parasitária tecidual não foi possível ser avaliada.

Em conjunto, os resultados obtidos mostraram que os ésteres de galato, sobretudo o galato de dodecila, apresentaram uma potente atividade tripanocida *in vitro*, superior ao do benzonidazol. Entretanto, nenhum dos galatos testados foi capaz de alterar o curso das infecções aguda e crônica em camundongos experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*. Por outro lado, a diminuição da inflamação tecidual, observada em camundongos tratados com o galato de dodecila ou com o ácido gálico, somada aos resultados da RT-qPCR, sugerem um papel anti-inflamatório mediado via imunomodulação negativa de IFN- γ . O desenvolvimento de farmacomodulações que possam aumentar a biodisponibilidade do ácido gálico e/ou do galato de dodecila poderá trazer novas perspectivas de investigação sobre o possível papel na imunomodulação e prevenção de danos cardíacos na tripanosomíase experimental.

7. CONCLUSÕES

- Os ésteres de galato avaliados reduziram entre 58% a 79% a viabilidade de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Entretanto, nenhum deles foi mais potente que o quimioprolifático violeta de genciana;
- Todos os ésteres de galato testados apresentaram atividade tripanocida superior ao benzonidazol contra formas amastigotas das cepas Y e Colombiana de *T. cruzi* em células fagocíticas e não fagocíticas, com destaque para o galato de dodecila (IS > 50);
- O uso combinado do galato de dodecila (0,5 µM) e do benzonidazol (5 µM) produziu um efeito aditivo (IC = 1,0) *in vitro* contra formas amastigotas da cepa Y em células Vero, mas não potencializou o efeito do benzonidazol no modelo crônico da infecção murina pelo *T. cruzi*;
- A análise ultraestrutural mostrou que o galato de dodecila induziu alterações morfológicas em formas epimastigotas e amastigotas intracelulares, com sinais de esvaziamento citoplasmático, diminuição de reservossomos e intumescimento da mitocôndria, sem afetar o kDNA do parasito e a célula hospedeira;
- O ácido gálico apresentou efeito inibitório sobre a TcTR heteróloga (CI₅₀ = 45,6 µM), alvo validado para a pesquisa de compostos tripanocidas, sem interferir na atividade enzimática da GR de *S. cerevisiae*;
- A despeito do potente efeito tripanocida *in vitro*, nenhum dos ésteres de galato avaliados foi capaz de suprimir a parasitemia e/ou prevenir a mortalidade de camundongos na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*;

- Camundongos tratados com ácido gálico ou com galato de dodecila na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* apresentaram uma expressiva redução do infiltrado inflamatório nos músculos cardíaco e esquelético, sugerindo um papel anti-inflamatório destes compostos;
- A RT-qPCR no tecido cardíaco de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e tratados com o galato de dodecila revelou níveis de transcrição de IFN- γ três vezes menores em relação ao grupo não tratado, sugerindo uma possível participação deste composto no controle da inflamação tecidual via imunomodulação negativa do IFN- γ .

8. REFERÊNCIAS

ABE, I.; SEKI, T.; NOGUCHI, H. Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloyl esters. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.270, n.1, p.137-140, 2000.

ALARCÓN DE NOYA, B.; DÍAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R.; SUAREZ, J.A.; ABATE, T.; NARANJO, L.; PAIVA, M.; RIVAS, L.; CASTRO, J.; MÁRQUES, J.; MENDOZA, I.; ACQUATELLA, H.; TORRES, J.; NOYA, O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v.201, n.9, p.1308-1315, 2010.

ALBINO, D.B.L. **Avaliação da atividade tripanocida de compostos fenólicos**. 2005, 74f.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ALIBERTI, J.C.; SOUTO, J.T.; MARINO, A.P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M.M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Pathology**, v.158, n.4, p.1433-1440, 2001.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.100, p.1 63-172, 1999.

ANTÚNEZ, M.I.; CARDONI, R.L. IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v.71, p.103-109, 2000.

ARAÚJO, M.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.; BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **The Journal of Antimicrobial Chemothererapy**, v.45, n.6, p.819-824, 2000.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GOMES, J.A.; CANÇADO, J.R.; FERRARI, T.C.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.; MOREIRA, M.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **The Journal of Infectious Diseases**, v.182, n.2, p.634-638, 2000.

BATISTA, D.G.; BATISTA, M.M.; DE OLIVEIRA, G.M.; DO AMARAL, P.B.; LANNES-VIEIRA, J.; BRITTO, C.C.; JUNQUEIRA, A.; LIMA, M.M.; ROMANHA, A.J.; SALES JUNIOR, P.A.; STEPHENS, C.E.; BOYKIN, D.W.; SOEIRO, M.N. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.7, p.2940-2952, 2010.

BELTRÃO, H.B.; CERRONI, M.P.; FREITAS, D.R.; PINTO, A.Y.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; COSTA, E.G.; SOBEL, J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. **Tropical Doctor**, v.39, n.4, p.231-232, 2009.

BENAIM, G.; SANDERS, J.M.; MARCHÁN-GARCIA, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDERA, A.R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J.M.; LEON-ROSSELL, A.; CONCEPCION, J.L.; SCHIJMAN, A.G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.892-899, 2006.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, R. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, v.15, p.22-28, 1999.

BONNET, B.; SOULLEZ, D.; GIRAULT, S.; MAES, L.; LANDRY, V.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C. Trypanothione reductase inhibition/trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl) piperazine series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, n.1, p.95-103, 2000.

BOUTAYEB, A. Development countries and neglected diseases: challenges and perspectives. **International Journal for Equity in Health**, v.6, p.1-4, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.4, p.389-396, 1962.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (eds.), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.379-388.

BRENER, Z.; COSTA, A.G.; CHIARI, C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.18, n.6, p.450-455, 1976.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.114, p.103-110, 1997.

BRIONES, M.R.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.104, p.219-232, 1999.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.111, p.95-105, 2000.

BRITTO, C.C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, Suppl 1, p.122-135, 2009.

CALABRESE K, LAGRANGE PH, DA COSTA SC. Chagas' disease: enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v.18, n.8-9, p.505-514, 1996.

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. **Infection and Immunity**, v.64, p.128-138, 1996.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p.484-490, 1985.

CALLA-MAGARINOS, J.; GIMÉNEZ, A.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as anti-leishmania agen in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon- γ production in polyclonally activated cells. **Clinical Immunology**, v.69, p.251-258, 2009.

CAMARGO, M.E. Serological diagnosis – An Appraisal of Chagas disease serodiagnosis. In: WENDEL, S. et al. (eds.). **Chagas disease (American Trypanosomiasis), its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, p.165-178.

CHÁVEZ JH, LEAL PC, YUNES RA, NUNES RJ, BARARDI CR, PINTO AR, SIMÕES CM, ZANETTI CR. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v.116, n.1-3, p.53-59, 2006.

CHEN, S.C.; CHUNG, K.T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, n.1, p.1-5, 2000.

CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B.; PRADO, M.A.; ALVES, R.J.; GALVÃO, L.M.; ARAUJO, F.G.

Potential use of WR6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted American trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.3, p.613-615, 1996.

CHIBALE, K.; MUSONDA, C.C. The synthesis of parasitic cysteine protease and trypanothione reductase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.18, p.1863-1889, 2003.

CHOU, T.C. Preclinical *versus* clinical drugs combination studies. **Leukemia & Lymphoma**, v.49, n.11, p.2059-2080, 2008.

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v.22, p.27-55, 1984.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEL, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.6, p.421-464, 1998.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v.465, n.7301, (Suppl), s12-s15, 2010a.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v.465, n.7301, (Suppl), s4-s5, 2010b.

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.4, p.549-554, 2009.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v.115, n.1-2, p.5-13, 2010.

COURA, J.R.; DIAS, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, Suppl.1, p.31-40, 2009.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, n.7301, (Suppl), s6-s7, 2010.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564–582, 1999.

CROFT, S.L. The current status of antiparasite chemotherapy. **Parasitology**, v.114, p.83-96, 1997.

CRUZ, F.S.; MARR, J.J.; BERENS, R.L. Prevention of transfusion-induced Chagas' disease by amphotericin B. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v.29, n.5, p.761-765, 1980.

CUNHA-SILVA, N.L.; ATELLA, G.C.; PORTO-CARREIRO, I.A.; MORGADO-DIAZ, J.A.; PEREIRA, M.G.; DE SOUZA, W. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v.214, n.1, p.7-12, 2002.

DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.2, p.207-211, 2006.

DE BARIOGLIO, S.R.; LACUARA, J.L.; DE OLIVA, P.P. Effects of clomipramine upon motility of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Parasitology**, v.73, n.2, p.451-452, 1987.

DE PAULA COSTA, G.; SILVA, R.R.; PEDROSA, M.C.; PINHO, V.; DE LIMA, W.G.; TEIXEIRA, M.M.; BAHIA, M.T.; TALVANI, A. Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. **Parasite Immunology**, v.32, n.3, p.202-208, 2010.

DE FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v.2, n.3, p.226-235, 2006.

DE SOUZA, W. O parasite e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (eds.),

***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.88-126.

DIAS, J.CP.; MACEDO, V.O. Doença de Chagas. In: COURA, J.R. (ed.), **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.557-593.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v.141, p.2407-2412, 1988.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, p.1157-1164, 2001.

DOCAMPO, R.; SCHMUÑIS, G. A. Sterol biosynthesis inhibitors: potential chemotherapeutics against Chagas disease. **Parasitology Today**, v.13, p.129-130, 1997.

DOENHOFF, M.J.; SABAH, A.A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; BAIN, J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.8, p.947-951, 1987.

DOS SANTOS, P.V.; ROFFÊ, E.; SANTIAGO, H.C.; TORRES, R.A.; MARINO, A.P.; PAIVA, C.N.; SILVA, A.A.; GAZZINELLI, R.T.; LANNES-VIEIRA, J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes and Infection**, v.3, n.12, p.971-984, 2001.

DUSCHAK, V.G.; COUTO, A.S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v.2, n.1, p.19-51, 2007.

AIRLAMB, A.H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine

cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, v.227, n.4693, p.1485-1487, 1985.

FAO/WHO: **Committee on Food Additives/WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 1974. Geneva.

FEDERICI, E.E.; ABELMANN, W.H.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.13, p.272-280, 1964.

FERRAZ, M.L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O.; URBINA, J.A.; ROMANHA, A.J. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1, p.174-179, 2008.

FERREIRA, J.; COLOMA, L.; FONES, E.; LETELIER, M.E.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; ALDUNATE, J. Effects of t-butyl-4-hydroxyanisole and other phenolic antioxidants on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. **FEBS Letters**, v.234, n.2, p.485-488, 1988.

FERREIRA, M.E.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A.R.; SCHININI, A.; BILBAO, N.V.; SERNA, E.; LAGOUTTE, D.; SORIANO-AGATÓN, F.; POUPON, E.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.258-263, 2007.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. A rapid method for testing *in vivo* the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.2, p.221-225, 1984.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, p.755-759, 1987.

FORTÉA, J.O.; LLAVE, E.; REGNAULT, B.; COPPÉE, J.Y.; MILON, G.; LANG, T.; PRINA, E. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. **BMC Genomics**, v.10, n.119, p.1-11, 2009.

FRAYHA, G.J.; SMYTH, J.D.; GOBERT, J.G.; SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **General Pharmacology**, v.28, n.2, p.273-299, 1997.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, n.3, p.193-201, 2002.

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

GIRAULT, S.; DAVIOUD-CHARVET, T.E.; MAES, L.; DUBREMETZ, J.F.; DEBREU, M.A.; LANDRY V.; SERGHERAERT, C. Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.9, n.4, p.837-846, 2001.

GRADY, R.W.; BIENEN, E.J.; CLARKSON, A.B. JR. Esters of 3,4-dihydroxybenzoic acid, highly effective inhibitors of the sn-glycerol-3-phosphate oxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.21, n.1, p.55-63, 1986.

GÜIDA, M.C.; ESTEVA, M.I.; CAMINO, A.; FLAWIÁ, M.M.; TORRES, H.N.; PAVETO, C. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). **Experimental Parasitology**, v.117, n.2, p.188-194, 2007.

GURU, P.Y.; AGRAWI, A.K.; SINGHA, U.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using

tuftsin-bearing liposomes as drug vehicles. **Federation of European Biochemical Societies**, n.1, v.2, p.204-208, 1989.

HAMILTON, C.J.; SARAVANAMUTHU, A.; EGGLESTON, I.M.; FAIRLAMB, A.H. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **The Biochemical Journal**, v.369, p.529-537, 2003.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SIANI, A.C.; PEREIRA, J.F.G.; PINHEIRO, E.S. Plantas Medicinais e medicamentos fitoterápicos no combate a doenças negligenciadas: uma alternativa viável? **Revista Fitos**, v.1, n.1, p.30-35, 2005.

HSU, C.L.; YEN, G.C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. **British Journal of Nutrition**, v.98, n.4, p.727-735, 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*. **Journal of Immunology**, v.158, p.3311-3316, 1997.

INHOFF, O.; RICHARDS, J.M.; BRÎET, J.W.; LOWE, G.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Coupling of a competitive and an irreversible ligand generates mixed type inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.20, p.4524-4530, 2002.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.A.; WILKINSON, S.R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n.6, p.733-742, 2008.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.48, n.3, p.348-357, 1993.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v.90, Suppl. 2, p.S55-S62, 2003.

KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O.; FERREIRA, D.; KOLODZIEJ, H. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.56, n.5, p.444-454, 2001.

KOIDE, T.; NOSE, M.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; OHTA, N. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. **Planta Medica**, v.64, n.1, p.27-30, 1998.

KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; ITO H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; FOO, L.Y. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha release in macrophages *in vitro*. **Planta Medica**, v.67, n.9, p.825-832, 2001.

KRATZ, J.M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; KOLLING, D.J.; LEAL, P.C.; CIRNE-SANTOS, C.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; FRUGULHETTI, I.C.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.437-442, 2008.

KRIEGER, S.; SCHWARZ, W.; ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CLAYTON, C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v.35, n.3, p.542-552, 2000.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.23, p.6692-6696, 2002a.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; NIHEI, A. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.5, p.1072-1076, 2004.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; XIAO, P.; HARAGUCHI, H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3533-3539, 2002b.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, n.3, p.347-350, 2001.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, v.14, n.1, p.36-42, 2007.

LANNES-VIEIRA, J.; SOEIRO, M.N.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ARAÚJO-JORGE, T.C. Chagas disease centennial anniversary celebration: historical overview and prospective proposals aiming to maintain vector control and improve patient prognosis - a permanent challenge. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, Supl.1, p.5-7, 2009.

LANZA, S.R.; MENIN, A.; ERTL, H.C.; BÁFICA, A.; PINTO, A.R. Simian recombinant adenovirus delivered by the mucosal route modulates gammadelta T cells from murine genital tract. **Vaccine**, v.28, n.29, p.4600-4608, 2010.

LAZARDI, K.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.34, n.11, p.2097-2105, 1990.

LEE, S.H.; PARK, H.H.; KIM, J.E.; KIM, J.A.; KIM, Y.H.; JUN, C.D.; KIM, S.H. Allose gallates suppress expression of pro-inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB in human mast cells. **Planta Medica**, v.73, n.8, p.769-773, 2007.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Autoimmunity in Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.555-561, 2001.

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S.E.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, v.145, p.357-364, 2006.

LIENDO, A.; LAZARDI, K.; URBINA, J.A. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.41, n.2, p.197-205, 1998.

LIN, J.K.; LIANG, Y.C. Cancer chemoprevention by tea polyphenols. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China**, v.24, n.1, p.1-13, 2000.

LOOSDRECHT, A.A.; NENNEL, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGESNHUIJSEN, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. a methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v.141, p.15-22, 1991.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.4, p.1-16, 2002.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S. – *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.335-340, 2000.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v.47, n.3, p.469-474, 1974.

MARTINS, H.R.; FIGUEIREDO, L.M.; VALAMIEL-SILVA, J.C.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; VITELLI-AVELAR, D.M.; BAHIA, M.T.; MARTINS-FILHO, O.A.; MACEDO, A.M.;

LANA, M. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, n.6, p.1319-1327, 2008.

MASAKI, H.; OKAMOTO, N.; SAKAI, S.; SAKURAI, H. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.20, p.304-308, 1997.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.601-620, 2007.

MEIRELLES, R.M.S.; SOARES, M.J. Quick fixation of eukariotic cell suspensions for routine transmission electron microscopy. **Acta Microscopica**, v.10, n.1, p.19-22, 2001.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; SANTA-RITA, R.M.; SOARES, M.J.; BARBOSA, H.S.; CASTRO S.L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v.40, p.157-168, 2009.

MEZIANE-CHERIF, D.; AUMERCIER, M.; KORA, I.; SERGHERAERT, C.; TARTAR, A.; DUBREMETZ, J.F.; OUAISSI, M.A. *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. **Experimental Parasitology**, v.79, n.4, p.536-541, 1994.

MILES, M.A., SOUZA, A.A., POVOA, M., SHAW, J.J., LAINSON, R., TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v.272, p.819-821, 1978.

MIYAMOTO, C.T.; GOMES, M.L.; MARANGON, A.V.; DE ARAÚJO, S.M.; BAHIA, M.T.; MARTINS-FILHO, O.A.; DE LANA, M.; DE ORNELAS TOLEDO, M.J. Usefulness of the polymerase chain reaction for monitoring cure of mice infected with different

Trypanosoma cruzi clonal genotypes following treatment with benznidazole. **Experimental Parasitology**, v.120, n.1, p.45-49, 2008.

MOLINA, J.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; URBINA, J.A. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p.137-140, 2000a.

MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J.A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.1, p.150-155, 2000b.

MORAES-SOUZA, H.; PIANETTI, G.M.; BARRETTO, O.C.; NONOYAMA, K.; GROLG, M.; CHIARI, E. Aminoquinolone WR6026 as a feasible substitute for gentian violet in Chagas' disease prophylaxis in preserved blood for transfusional purposes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.563-569, 2002.

MOSER B, LOETSCHER P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature Immunology**, v.2, n.2, p.123-128, 2001.

MÜLLER, S.; COOMBS, G.H.; WALTER, R.D. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. **Trends in Parasitology**, v.17, n.5, p.242-249, 2001.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. **Advances in Pharmacology**, v.26, p.19-33, 1994.

MURTA, S.M.F.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.93, p.203-214, 1998.

NEAL, R.A.; VAN BUEREN, J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* *in vivo* and *in*

vitro. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.5, p.709-714, 1988.

NOSE, M.; KOIDE, T.; MORIKAWA, K.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; OHTA, N. Formation of Reactive Oxygen Intermediates Might be Involved in the Trypanocidal Activity of Gallic Acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.21, n.6, p.583-587, 1998.

OLIVEIRA, R.B.; ZANI, C.L.; FERREIRA, R.S; LEITE, R.S.; ALVES. T.M.A.; SILVA, T.H.A.; ROMANHA, A.J. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona redutase. **Química Nova**, v.31, n.2, p.261-267, 2008.

OLIVIERI, B.P.; DE SOUZA, A.P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; DE CASTRO, S.L.; ARAU'JO-JORGE, T. *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Experimental Parasitology**, v.114, p.228–234, 2006.

ORTIZ-ORTIZ L.; ORTEGA, T.; CAPIN, R.; MARTINEZ, T. Enhanced mononuclear phagocytis activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.50, p.232-242, 1976.

OPAS: **ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE**, 2000. O Controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América – História de uma iniciativa internacional 1991/2001, p.16-43.

OW, Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, v.4, p.241-248, 2003.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E₂. **Clinical and Experimental Medicine**, v.1, p.137-143, 2001.

PINAZO, M.J.; ESPINOSA, G.; GÁLLEGO, M.; LÓPEZ-CHEJADE, P.L.; URBINA, J.A.; GASCÓN, J. Successful treatment with

posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p.583-587, 2010.

PINTO, A.Y.; VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; FERREIRA JUNIOR, A.G.; COURA, J.R. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.6, p.602-614, 2008.

PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v.9, p.422-426, 2003.

PIZZOLATTI, M.G.; MENDES, B.G.; CUNHA JR.; A.; SOLDI, C.; KOGA, A.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A. W. Bennet (Polygalaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p.177-182, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.92-100, 2001.

RASSI, A.; RASSI JR., A. Doença de Chagas. In: AMATO-NETO, V.; GRYSCHKE, R.C.B.; AMATO, V.S.; TUON, F.F. (eds). **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p.127-138.

RATES, S.M.K. Review: Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2000.

REDDY, M.; GILL, S.S.; KALKAR, S.R.; WU, W.; ANDERSON, P.J.; ROCHON, P.A. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v.298, n.16, p.1911-1924, 2008.

RENSLO, A.R.; McKERROW, J.H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, v.2, n.12, p.701-710, 2006.

RIVAROLA, H.W.; BUSTAMANTE, J.M.; LO PRESTI, S.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.E.; GEA, S.; FRETES, R.; PAGLINI-OLIVA, P. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. **Experimental Parasitology**, v.111, n.2, p.80-86, 2005.

RIVAROLA, H.W.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.E.; FRETES, R.; GEA, S.; PAGLINI-OLIVA, P. Effects of clomipramine on *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical and Medicine Hygiene**, v.95, n.5, p.529-533, 2001.

RODRIGUES, J.C.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitions. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, n.9, p.925-938, 2008.

RODRIGUEZ, A.M.; SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H.; CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. **Infection and Immunity**, v.31, p.524-529, 1981.

RODRIGUEZ, J.B. Specific molecular targets to control tropical diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v.7, p.1105-1116, 2001.

ROMANHA, A.J. **Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi***. 1982. 110f.. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

ROMANHA, A.J.; ALVES, R.O.; MURTA, S.M.; SILVA, J.S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.6, p.823-828, 2002.

ROMANHA, A.J.; CASTRO, S.L.; SOEIRO, M.N.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L.I.; BAHIA, M.T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z.A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug

screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p.233-238, 2010.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. Antiprotozoal compounds from *Psorothamnus polydenius*. **Journal of Natural Products**, v.68, n.1, p.108-111, 2005.

SAMBROOK, J. FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. V. 32nd edition., New York; Cold Spring Harbor, 2001.

SAVI, L.A.; LEAL, P.C.; VIEIRA, T.O.; ROSSO, R.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CREZYNSKI-PASSA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v.55, n.1, p.66-75, 2005.

SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, n.11, p.1239-1259, 2002.

SCHMUÑIS, G.A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, Suppl 1, p.93-101, 1999.

SCHMUÑIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, Suppl 1, p.75-85, 2007.

SCHULTES, R.E. The kingdom of plants. In: THOMSON, W.A.R. (ed.). **Medicines from the Earth**. New York: McGraw-Hill, 1978, p.208.

SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents and Chemotherapy**, v.49, n.2, p.549-555, 2005.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v.61, p.1053-1071, 1998.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.813-823, 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.111-115, 1998.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v.20, p.201-210, 1953.

SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M. Fosforilação oxidativa e função mitocondrial. In: **Bioquímica médica básica de Marks**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, p.380-398.

SOARES, M.J. The reservosomo of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: na organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, Suppl.1, p.139-141, 1999.

SOEIRO, M.N.C; DANTAS, A.P.; DALIRY, A.; SILVA, C.F.; BATISTA, D.G.J.; SOUZA, E.M.; OLIVEIRA, G.M.; SALOMÃO, K.; BATISTA, M.M.; PACHECO, M.G.O.; SILVA, P.B.; SANTA-RITA, R.M.; BARRETO, R.F.S.M.; BOYKIN, D.W.; DE CASTRO, S.L. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, Suppl.I, p.301-310, 2009.

SOEIRO, M.N.C.; DE CASTRO, S.L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.13, p.105-121, 2009.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.3, p.141–152, 1996.

SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.62, p.45–52, 1993.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C.C.; YI, W.; FISCHER, J.; KREWER, G. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.2705–2713, 2007.

STEINDEL, M., DIAS, J.C.P., ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v.37, n.217, p.32–37, 2005.

STEINDEL, M., PACHECO, L.K., SCHOLL, D., SOARES, M., MORAES, M.H., EGER, I., KOSMANN, C., SINCERO, T.C.M., STOCO, P.H., MURTA, S.M.F., CARVALHO PINTO, C.J., GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, p.25–32, 2008.

STRIPPOLI, V.; DAURIA, F.D.; TECCA, M.; CALLARI, A.; SIMONETTI, G. Propyl gallate increases in vitro antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, n.1, p.73–76, 2000.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drugs Discovery Today**, v.5, n.2, p.39–41, 2000.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.12, p.1965–1969, 2004.

TARGETT, G.A. Chemotherapy and the immune response in parasitic infections. **Parasitology**, v.90, p.661–673, 1985.

TARLETON, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.430-434, 2007.

TARLETON, R.L.; REITHINGER, R.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. The Challenges of Chagas Disease - Grim Outlook or Glimmer of Hope? **PLoS Medicine**, v.4, p.1852-1857, 2007.

TARLETON, R.L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v.62, p.1820-1829, 1994.

TEIXEIRA, A.R.; MONTEIRO, P.S.; REBELO, J.M.; ARGANARAZ, E.R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C.A.; SILVA, A.R.; AULT, S.K.; COSTA, J.M. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.1, p.100-112, 2001.

TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in Parasitology**, v.18, n.6, p.262-265, 2002.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, p.222-235, 2007.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.1, p.85-104, 1998.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. **Parasitology Today**, v.3, p.189-190, 1987.

TONA, L.; CIMANGA, R.K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; L. PIETERS; TOTTÉ, J.; VLIETINCK, A.J. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in

the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.27-32, 2004.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDN, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v.359, n.9324, p.2188-2194, 2002.

TURRENS, J.F.; WATTS JR., B.P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.82, p.125-129, 1996.

URBINA, J.A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v.117, p.91-99, 1997.

URBINA, J.A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, Suppl. I, p.311-318, 2009.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p.495-501, 2003.

URBINA, J.A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF-86327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, p.1237-1242, 1988a.

URBINA, J.A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R. Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of ICI 195,739, a Novel Bis-Triazole Derivative, on Epimastigotes and Amastigotes of

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.730-735, 1991.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L.M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG, D. Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.7, p.1771-1777, 1998.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J., LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.39-48, 2003a.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A.J. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.27-38, 2003b.

URBINA, J.A.; VIVAS, J.; RAMOS, H.; LARRALDE, G.; AGUILAR, Z.; AVILAN, L. Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketocanazole. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.30, p.185-196., 1988b.

VAIDIAN, A.K.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B. Chagas' disease and AIDS. **Kinetoplastid Biology Disease**, v.3, p.1-6, 2004.

VANNIER-SANTOS, M.A.; DE CASTRO, S.L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Current Drug Targets**, v.10, n.3, p.246-260, 2009.

WANG, C.C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. **Parasitology**, n.114, p.31-44, 1997.

WATKINS, B.M. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p.477-478, 2003.

WHO: **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO, 115p.

WHO: **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 2002. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 109p.

WHO: **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 2004. Changing History. Geneva: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2004/en/>. Acesso em 15 de julho de 2010.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, v.84, p.203-213, 1996.

ZHU, M.; PHILLIPSON, J.D.; GREENGRASS, P.M.; BOWERY, N.E.; CAI, Y. Plant Polyphenols: Biologically active compounds or non-selective binders to protein? **Phytochemistry**, v.44, n.3, p.441-447, 1997.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, Suppl 1, p.159-164, 1999.

