UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de
Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção.**

Daniele da Silva Ferreira

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientanda: Daniele da Silva Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Daniele da Silva

Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção. Ribeirão Preto, 2010.
102p.: il.;30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio.

1. Doença de Chagas. 2. Atividade tripanocida, 3. Ácido ursólico, 4. Ácido oleanólico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniele da Silva Ferreira

Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Sérgio de Albuquerque

Aprovado em: / /

Banca examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Tudo Posso

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim, e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar, na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória
Vou persistir, continuar a esperar e crer...
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!*

“Senhor, Pai de Eterna Misericórdia, se cheguei até aqui não foi por mérito meu, mas porque o Senhor assim me permitiu. Perdoa-me por toda ingratidão do meu coração de filha limitada e pequena, e aceita com bons olhos minha vontade de sempre permanecer perto de Ti. Confio em Tua Misericórdia, e acredito que somente por ela o Senhor me perdoa e me concede sempre uma nova oportunidade. Guia-me Senhor pra onde Lhe aprouver... quero ser sempre esse barco a vela solto pelo mar que é Deus, e que o vento forte do Teu Espírito Santo

me impulsione até o fim dos meus dias. Pela poderosa intercessão de Maria Santíssima, a Virgem do Silêncio, e de Santa Rita de Cássia... Amém.”

Aos meus pais Davi e Rita

Depois de Deus, vocês são as pessoas mais importantes e responsáveis por essa conquista. Eternamente grata eu serei a Deus por ter-me permitido nascer nessa família tão simples e tão unida, e por conceder-me a graça de contar com a vida, a saúde e o apoio de vocês até hoje. Obrigada por tudo... todo o amor, afeto, cuidado e dedicação. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Danilo e Rodrigo, (e cunhadas Adriana e Tatiane) por todo o carinho, amizade e incentivo. Agradeço por toda a força que posso receber de vocês dia após dia. Vocês fazem parte de mim!

A minha sobrinha, Luanna, e aos meus “irmãos” Ana Laura, Guilherme e Leonardo por toda a alegria, ingenuidade e inocência que vocês me transmitem todos os dias. Amo demais.

Ao meu namorado, Guilherme, por toda a paciência, carinho e apoio em tantos momentos na vida pessoal e profissional ... no passado e no presente!

Agradecimentos especiais

*Ao meu orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque
Os meus sinceros agradecimentos pela confiança e oportunidade.
Toda minha admiração e respeito.*

Aos docentes de parasitologia da FCFRP-USP Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior e Prof. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão.

*À Viviane Rodrigues Esperandim
Sua amizade e participação direta tornaram possível a realização deste trabalho. Agradeço sua presença e amizade na vida pessoal e profissional.*

*À Miram Paula Alonso Toldo
Agradeço por seus conhecimentos que guiaram passos importantes deste trabalho.*

*Aos funcionários da disciplina de Parasitologia, Toninha e Georgius por todo auxílio recebido e principalmente pela amizade.
Ao José Carlos Tomaz do Departamento de Física e Química por seu auxílio e disponibilidade.*

A todos os pós graduandos do Laboratório de Parasitologia.

À Juliana Saraiva por todo apoio e dedicação.

Às secretárias, em especial, Vânia de Albuquerque por todo carinho e dedicação.

A todos da Universidade de Franca, Prof. Dr. Márcio Luis Andrade e Silva, Cidinha, Martinha, Maria Helena e José Luiz, pelos valiosos ensinamentos e por todo o espaço cedido para a realização de algumas etapas deste trabalho. E em especial ao Prof. Dr. Wilson Roberto Cunha, por estar sempre disposto a me auxiliar nestes 10 anos de trabalho. Com certeza você é um dos maiores responsáveis por todas as minhas conquistas. Muito obrigada!

Aos meus familiares, em especial, Jorge e Vera, Maria e Sebastiana, pelas intensas orações, e ao saudoso José João da Silva, por torcer e acreditar em mim.

À Deus por me cumular de forças e esperanças principalmente nos momentos mais difíceis.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela realização dos cursos de Mestrado e Doutorado.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

RESUMO

FERREIRA, D. S. **Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental – avaliação em fase aguda da infecção.** 2010. 102f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A doença de Chagas é um problema de saúde pública, com dados preocupantes referentes ao número de pessoas contaminadas e daquelas que ainda permanecem expostas ao risco de infecção. As doenças tropicais desafiam as pesquisas científicas, pois os medicamentos existentes apresentam sérios efeitos colaterais. As tripanossomíases são doenças de grande importância no Brasil, como é o caso da doença de Chagas. Estudos realizados em diversos países têm relatado que muitas espécies vegetais possuem atividade contra o agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. Ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico, pertencem à classe de compostos triterpenóides e são amplamente distribuídos no reino vegetal e têm sido frequentemente isolados como mistura isomérica. Nesse sentido, a proposta para o presente estudo foi avaliar a atividade tripanocida, sobre a cepa Y e Bolívia de *T. cruzi*, dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, sintetizar e avaliar a atividade tripanocida do sal derivado de ácido ursólico. As substâncias foram administradas nas concentrações de 20 e 50 mg/kg por via intraperitoneal e oral, após a avaliação da dose letal média (DL₅₀). As três substâncias empregadas nas concentrações de 20 e 50 mg/kg, administradas por via intraperitoneal não foram capazes de reduzir a parasitemia dos animais experimentalmente infectados com as cepas Y e Bolívia

de *T. cruzi*. Entretanto, as três substâncias exibiram atividade tripanocida significativa, na concentração de 50 mg/kg, administradas por via oral, em animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Para a cepa Bolívia de *T. cruzi*, as substâncias administradas por via oral exibiram atividade biológica na concentração de 20 mg/kg, sendo significativa apenas para o triterpeno ácido ursólico. A análise histológica realizada não demonstrou uma correlação significativa entre os níveis parasitêmicos e o parasitismo tecidual, para todos os grupos avaliados. A avaliação do perfil hepatobiliar e renal das substâncias foi realizada a fim de se verificar possíveis efeitos tóxicos das mesmas. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, indicando que o aumento dos níveis parasitêmicos não está associado ao efeito das substâncias no tecido. Através da avaliação do efeito dos triterpenos sobre a resposta imune, verificamos uma diminuição dos níveis plasmáticos de IFN- γ e um aumento das concentrações de IL-10. Dessa maneira, nós sugerimos que o tratamento com essas substâncias pode direcionar a resposta imune para o padrão Th2 e, em consequência desse efeito imunossupressor, uma maior quantidade de formas tripomastigotas poderia ser observada na circulação do hospedeiro.

Palavras-chave: doença de Chagas, atividade tripanocida, ácido ursólico, ácido oleanólico.

ABSTRACT

FERREIRA, D.S. **Therapeutic properties of triterpene acids in experimental Chagas' disease - evaluation in the acute phase of infection.** 2010. 102 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Chagas disease is a public health problem with worrisome data on the number of infected people, not to mention the population that still remains at risk of infection. Tropical diseases defy scientific research since the existing drugs have serious side effects. Trypanosomiasis, such as Chagas disease, are of great importance in Brazil. Studies in several countries have reported that many plant species display activity against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Ursolic acid and its isomer, oleanolic acid, belong to a class of triterpenoid compounds that is widely distributed in the plant kingdom and has frequently been isolated as an isomeric mixture. In the present study, the trypanocidal activity of the triterpenoids ursolic acid and oleanolic acid was evaluated against the Y and Bolivia strains of *T. cruzi*. In addition, the potassium salt derivative of ursolic acid was synthesized and also tested. The triterpenoids were administered intraperitoneally and orally at concentrations of 20 and 50 mg / kg, after evaluation of the median lethal dose (LD₅₀). At the concentrations of 20 and 50 mg / kg, the intraperitoneal administration of each of the substances was not able to reduce parasitemia of the animals infected with the Y and Bolivia strains of *T. cruzi*. However, ursolic and oleanolic acid, as well as the potassium salt derivative of ursolic acid exhibited significant trypanocidal activity at a concentration of 50 mg /

kg when they were orally administered to animals infected with the Y strain of *T. cruzi*. On the other hand, oral administration of the tested compounds at a concentration of 20 mg / kg evidenced biological activity, which was significant for ursolic acid only. For the most of studied groups, histological analysis did not demonstrate a significant correlation between the levels of parasitemia and tissue parasitism. Determination and evaluation of biochemical parameters in the serum of experimental animals was performed, to assess the hepatic, biliary, and renal toxic effects of the substances. There were no statistically significant differences between the treated groups and the control group, indicating that the increase in parasitemia is not associated with the effects of the substances in the tissue. We suggest the hypothesis of an immunosuppressive effect, since there was a decreased plasma levels of IFN- γ after treatment with the triterpenes. Moreover, the treated groups also exhibited increased levels of IL-10. Therefore, we suggest that treatment with the substances could be directing the immune response toward the Th2 type and, as a consequence of this immunosuppressive effect, a greater amount of trypomastigotes could be observed in the circulation of the host.

Key words: Chagas' disease, trypanocidal activity, ursolic acid, oleanolic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico.....	18
Figura 2.	Estrutura química do sal derivado de ácido ursólico.....	19
Figura 3.	Espectro de massas (eletrospray-cone positivo) do sal de potássio do ácido ursólico.....	25
Figura 4.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg	28
Figura 5.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg	30
Figura 6.	Avaliação histológica do tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	32
Figura 7.	Avaliação histológica do tecido esplênico de animais infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	33
Figura 8.	Comportamento parasitêmico de animais infectados	

com a cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg 34

Figura 9. Comportamento parasitêmico de animais infectados com a cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg 35

Figura 10. Avaliação histológica do tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg..... 37

Figura 11. Avaliação histológica do tecido esplênico de animais infectados com a cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg..... 38

Figura 12. Comportamento parasitêmico de animais infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg..... 43

Figura 13. Comportamento parasitêmico de animais infectados a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg..... 45

Figura 14. Avaliação histológica do tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e

	tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	48
Figura 15.	Avaliação histológica do tecido esplênico de animais infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	49
Figura 16.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com a cepa Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg.....	50
Figura 17.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com a cepa Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg.....	51
Figura 18.	Avaliação histológica do tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	54
Figura 19.	Avaliação histológica do tecido esplênico de animais infectados com a cepa Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	55
Figura 20.	Comparação estatística dos valores obtidos para AST e ALT nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett.....	63

Figura 21.	Comparação estatística dos valores obtidos para GGT e ALP nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett.....	66
Figura 22.	Comparação estatística dos valores obtidos para uréia e creatinina nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett.....	69
Figura 23.	Comparação estatística dos valores obtidos para glicose nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett.....	72
Figura 24.	Comparação estatística dos valores obtidos para bilirrubina direta e total nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multi-comparativo de Dunnett.....	75
Figura 25.	Dosagem de IFN- γ	79
Figura 26.	Dosagem de IL-10.....	80
Figura 27.	Dosagem sérica de IL-4.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais do grupo tratado comparados ao grupo controle negativo. Cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Tabela 2-	Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais do grupo tratado comparados ao grupo controle negativo. Cepa Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
Tabela 3-	Valores máximos e mínimos obtidos referentes aos níveis séricos de aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT).....	62
Tabela 4-	Valores mínimos e máximos obtidos referentes aos níveis séricos de gama-glutamil tranferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP).....	64
Tabela 5-	Valores mínimos e máximos obtidos referentes aos níveis séricos de uréia e creatinina.....	68
Tabela 6-	Valores mínimos e máximos obtidos referentes aos níveis séricos de glicose.....	71
Tabela 7-	Valores mínimos e máximos obtidos referentes aos níveis séricos de bilirrubinas.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino tranferase
AU	Ácido ursólico
AO	Ácido oleanólico
BZ	Benzonidazol
CI	Controle infectado
CNI	Controle não infectado
CT AO	Controle de tratamento ácido oleanólico
CT AU	Controle de tratamento ácido ursólico
DL ₅₀	Dose Letal Média
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GGT	Gama-glutamil transferase
IFN- γ	Interferon gama
IL- 4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
KOH	Hidróxido de potássio
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato
T AU	Tratamento ácido ursólico
T AO	Tratamento ácido oleanólico

TH	T helper
TGF- β	Transforming Growth Factor-Beta
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-Alfa

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Chagas.....	1
1.2. Doença de Chagas e Resposta Imunológica.....	7
1.3. A importância da pesquisa de vegetais para a descoberta de novas substâncias para o tratamento de doenças tropicais.....	10
1.4. O gênero <i>Miconia</i> e a espécie vegetal <i>Miconia albicans</i>	12
1.5. Ácido ursólico e ácido oleanólico – duas substâncias naturais com potencial biológico.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Princípios éticos na Experimentação Animal.....	17
3.2. Parasito.....	17
3.3. Substâncias utilizadas.....	17
3.3.1. Ácido ursólico e ácido oleanólico.....	17
3.3.2. Preparação do sal de ácido ursólico.....	18
3.4. Ensaios biológicos sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
3.4.1 Determinação da Dose Letal Média (DL ₅₀).....	19
3.4.2. Grupos experimentais e avaliação da parasitemia.....	20
3.4.3. Avaliação Histológica.....	21
3.4.3.1. Técnica de Dissecção.....	21
3.4.3.2. Técnica Histológica.....	21
3.4.4. Avaliações bioquímicas.....	22
3.4.5. Dosagens IFN- γ , IL-10 e IL-4.....	23
3.4.6. Análise Estatística.....	24

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Identificação do sal derivado do ácido ursólico.....	25
4.2. Determinação da Dose Letal Média (DL ₅₀).....	26
4.3. Ensaio biológico <i>in vivo</i> sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
4.3.1. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Y de <i>T. cruzi</i> (via intraperitoneal – 20 mg/kg).....	28
4.3.2. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Y de <i>T. cruzi</i> (via intraperitoneal – 50 mg/kg).....	30
4.3.3. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	31
4.3.4. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> (via intraperitoneal – 20 mg/kg).....	34
4.3.5. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> (via intraperitoneal – 50 mg/kg).....	35
4.3.6. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	36
4.3.7. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Y de <i>T. cruzi</i> (via oral – 20 mg/kg).....	43
4.3.8. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Y de <i>T. cruzi</i> (via oral – 50 mg/kg).....	45
4.3.9. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	47
4.3.10. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> (via oral – 20 mg/kg).....	50
4.3.11. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre a cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> (via oral – 50 mg/kg).....	51

4.3.12. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.....	53
4.4. Avaliações bioquímicas.....	60
4.4.1. Determinação dos níveis aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT).....	61
4.4.2. Determinação de Gama-glutamil transferase (CGT) e fosfatase alcalina (ALP).....	64
4.4.3. Determinação de uréia e creatinina.....	67
4.4.4. Determinação dos níveis de glicose.....	70
4.4.5. Determinação dos níveis de bilirrubina.....	73
4.5. Interferência dos triterpenos na produção de interleucinas.....	77
5. CONCLUSÕES.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cujo ciclo de vida envolve hospedeiros mamíferos (incluindo humanos) e insetos vetores (várias espécies de triatomíneos). Esta doença tipicamente tropical é encontrada em todo continente americano (GOLDBAUM et al., 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 21 países tropicais onde a doença de Chagas é endêmica, aproximadamente 15 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 28 milhões permanecem expostas ao risco de infecção (WHO, 2007). Indivíduos infectados vivendo em regiões endêmicas e não endêmicas, geram a possibilidade de novos casos, por meio de mecanismos alternativos de transmissão de *Trypanosoma cruzi*, particularmente através das vias congênitas e transfusionais. Além disso, a persistência de focos silvestres tornou-se cada vez mais correlacionada com a transmissão oral da doença de Chagas humana, com cerca de 100 novos casos por ano (DIAS; PRATA; CORREIA, 2008).

A alteração do ciclo silvestre da doença, principalmente as florestas, e a migração da população humana dentro de cada país, influenciam a epidemiologia de todas as doenças transmissíveis, incluindo a doença de Chagas (PONCE, 2007). Ao longo das últimas décadas houve um aumento no número de pessoas infectadas vivendo em áreas urbanas. Este aumento aconteceu

principalmente devido às migrações das zonas rurais e, em segundo lugar, devido às transfusões sanguíneas (GOLDBAUM et al., 2004).

O triatomíneo após realizar a hematofagia em um hospedeiro, libera as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes ou urina que penetram através da solução de continuidade proliferando-se ativamente no interior de macrófagos. Findo este ciclo, as células parasitadas se rompem, liberando milhares de tripomastigotas que ganham a circulação sendo sua detecção no sangue periférico uma característica da fase aguda da doença (RIBEIRO DOS SANTOS; RASSI; KOBERLE, 1981).

O parasito é capaz de infectar e se multiplicar no interior de diferentes células do hospedeiro, incluindo macrófagos, células da musculatura lisa e esquelética, fibroblastos e neurônios. A primeira reação à infecção pelo *T. cruzi* é inflamação local que se deve à ruptura de células parasitadas (ANDRADE; ANDRADE, 2000). Após permanecerem assintomáticos por um longo período, muitos pacientes desenvolvem sintomas característicos relacionados ao sistema cardíaco e digestivo (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

As principais causas relacionadas à dificuldade de se combater o parasitismo, estão diretamente ligadas às características morfológicas e filogenéticas das diferentes populações do parasita existentes, que podem determinar um tropismo tecidual diferenciado e, conseqüentemente, diferentes manifestações clínicas da doença determinada pelo parasita (RIBEIRO; FERRIOLLI-FILHO; BELDA NETO, 1982; BELDA NETO; RIBEIRO, 1989).

Segundo Andrade (1976) existem cepas que apresentam predominância de formas tripomastigotas sangüícolas delgadas, que por sua vez

são mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes e apresentam tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com maior frequência esplenócitos, células do fígado e medula óssea. Como característica, apresentam altos e precoces picos parasitêmicos.

Entretanto, existem cepas que apresentam como característica morfológica predominante a presença de formas tripomastigotas sangüícolas largas, possuindo assim, marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (MARTINI et al., 1986). Esse tipo de conformação morfológica confere a esta cepa uma maior resistência aos anticorpos circulantes. Como consequência, permanece por mais tempo na corrente circulatória determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

A transmissão natural da doença ocorre durante a hematofagia, através da penetração de formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas fezes de triatomíneos, na pele do hospedeiro. Como doença caracteristicamente rural, tradicionalmente acomete pessoas de origem interiorana que habitam ou habitaram casas de baixa qualidade, onde facilmente se aloja e coloniza o inseto vetor (DIAS, 2007).

Muito embora o Brasil tenha recebido em 2006 o certificado de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, devemos lembrar os outros mecanismos de transmissão da infecção (FILHO et al., 2008). A emigração das zonas rurais às zonas urbanas, apesar de reduzir a população rural exposta a vetores infectados, aumenta a probabilidade de transmitir a infecção por meio da transfusão sanguínea. Dessa forma, apesar do

controle adotado em bancos de sangue a transfusão sanguínea consiste em um dos principais meios de transmissão da doença na zona urbana (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002).

A transmissão da doença através de transplante de órgãos pode desencadear fase aguda grave, pois o indivíduo que recebe um órgão transplantado infectado toma medicamentos imunossupressores e, conseqüentemente, torna-se menos resistente à infecção (LANA; TAFURI, 2005). Em casos de transplantes torna-se necessário a realização exame sorológico específico tanto para o doador como para o receptor (COURA; CASTRO, 2002).

A transmissão congênita não possui grande representatividade em áreas onde existe ainda a transmissão natural como forma principal de veiculação do parasita, mas pode vir a ser a via de manutenção da endemia chagásica, com a transmissão vetorial e transfusional controladas (SILVEIRA, 2000). Poucos são os Serviços de Pré-Natal que incluem, rotineiramente, exame do soro, para doença de Chagas, em gestantes procedentes ou naturais de áreas endêmicas para esta enfermidade (FILHO et al., 2008) e segundo a Organização Mundial de Saúde (2007), existe cerca de 14 mil novos casos da doença de Chagas congênita em países endêmicos anualmente.

Outras formas de disseminação da doença ocorrem através de casos agudos esporádicos e imprevisíveis de transmissão oral do parasito através de alimentos contaminados em distintas regiões do Brasil nos últimos quatro anos (DIAS, 2006; YOSHIDA, 2009). Acredita-se que triatomíneos infectados e/ou suas fezes contaminam alguma fase do processamento e consumo dos produtos, e que essa seria a via de transmissão (ROJAS et al., 2005).

Apesar da doença de Chagas ter sido descoberta há cem anos, apenas dois fármacos, nifurtimox e benzonidazol, se mostraram terapeuticamente eficazes para o tratamento da infecção por *T. cruzi* (BOSCARDIN et al., 2010). Essas substâncias são efetivas para o tratamento da fase aguda da infecção chagásica humana, porém apresentam baixo índice de cura na fase crônica da doença. O seu emprego em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias) causa efeitos colaterais indesejáveis e mesmo o nifurtimox que foi amplamente empregado, deixou de ser usado em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais que apresentava (COURA; CASTRO, 2002).

O Benzonidazol apresenta manifestações indesejáveis ao paciente em menor intensidade e, portanto, é o único anti-chagásico disponível no Brasil (ESTANI, 1998; CANÇADO, 2000). Apesar de sua baixa eficácia na fase crônica da doença, o tratamento com benzonidazol é sugerido de modo a retardar ou até mesmo evitar a evolução da doença crônica (CALDAS et al., 2008; CASTRO; SOEIRO, 2009). Nifurtimox e Benzonidazol atuam por meio da formação de radicais livres que, quando produzidos, ligam-se a lipídios, proteínas e DNA, lesando as células (DÍAZ DE TORANZO, et al., 1988; URBINA, 1999; MAYA et al., 2007). O tratamento é recomendado para todos os casos agudos e congênitos da doença de Chagas, em infecções crônicas reativadas e em indivíduos com idade inferior a 18 anos (OLIVEIRA et al., 2008).

O interesse pela pesquisa de substâncias com atividade biológica sobre *T. cruzi*, vem sendo desenvolvido com relativa intensidade, com o intuito de se obter compostos capazes de atuarem sobre o parasita, porém desprovidos dos sérios efeitos colaterais. De considerável importância é o desenvolvimento de

formulações pediátricas para possibilitar uma terapia mais correta e segura para crianças (JANNIN; VILLA, 2007). É lamentável que, no Brasil, só dispomos de um fármaco (benzonidazol), com ação parasiticida demonstrada, o que restringe muito o campo de ação no tratamento dessa doença (FILHO et al., 2008).

A necessidade de se prevenir a transmissão da doença por transfusão levou à busca por drogas que eliminem o parasita no sangue, ou seja, uma abordagem quimioprolática. Esta consiste na esterilização do sangue por substâncias que permitam transfundi-lo, com segurança, entre seres humanos. A violeta de genciana é o único agente empregado na quimioprofilaxia de sangue destinado a esse fim (SAÚDE- GUIMARÃES; FARIA, 2007).

Apesar de sua alta eficácia, encontram-se restrições à sua utilização, como, por exemplo, a coloração violácea induzida ao sangue tratado, sendo detectada posteriormente nos tecidos transfundidos. Possível ação mutagênica e diferença de sensibilidade entre várias cepas de *T. cruzi*, são fatores que restringem a utilização dessa substância (CHIARI et al., 1996; SOUZA et. al., 2002).

Portanto, a melhor maneira de combater a doença de Chagas ainda consiste nas ações profiláticas, como o combate químico sistemático aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue. (DIAS; MACEDO, 2005).

1.2. Doença de Chagas e Resposta Imunológica

A infecção do hospedeiro por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (ALIBERTI et al., 1996). Em consequência, o parasita passa a ser continuamente combatido, e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. No entanto, lesões teciduais resultantes dessa atividade imunológica prolongada acumulam-se e, eventualmente, levam às alterações funcionais musculares e nervosas características da doença de Chagas. Hoje está bem estabelecido que células e mecanismos efetores do sistema imune são responsáveis tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, pelo *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (ALIBERTI et al., 1996). As células *natural killer* (NK) desempenham um papel importante nessa fase que se relaciona com a destruição de células-alvo e com a produção de citocinas envolvidas na sensibilização de outras células imunes (SCOTT; TRINCHIERI, 1995). Estas células são importante fonte de IFN- γ e TNF- α , duas citocinas relevantes na ativação de outras células, como macrófagos, capacitando-as a destruir microrganismos intra e extracelulares (HUNTER; SLIFER; ARAÚJO, 1996).

A replicação do parasita nos macrófagos é aparentemente regulada por citocinas, que afetam, não apenas o desenvolvimento da infecção, mas também a mortalidade da doença. Dentre as citocinas estudadas, o IFN- γ tem sido associado à resistência do hospedeiro à infecção durante a fase aguda (SILVA et al., 1992; SAMUDIO et al., 1998). Nessa fase, a principal fonte de produção de IFN- γ é a célula NK; a produção de IFN- γ por linfócitos T ocorre só tardiamente. Outras citocinas, como IL-10 e TGF- β , estão associadas à susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 1992), devido, provavelmente, a seu papel inibidor da atividade de IFN- γ . Cardillo et al., (1996) mostraram que a produção de IFN- γ por células mononucleares, induzida por *T. cruzi* *in vitro* ou *in vivo*, seria regulada pela IL-10, sugerindo que a maior ou menor resistência observada na fase inicial da infecção (fase aguda) poderia ser uma consequência do balanço IFN- γ / IL-10 (SILVA et al., 1998).

Alguns trabalhos demonstram que o padrão de produção de citocinas determina o direcionamento da infecção por *T. cruzi*. Relatam ainda que a inibição gênica em animais knockout, de IFN- γ , TNF- α e IL-12, agrava a infecção por *T. cruzi* (GALVÃO DA SILVA et al., 2003; SILVA et al., 1995).

Como outros microrganismos patogênicos, *T. cruzi* é capaz de induzir a ativação de proteínas e enzimas efetoras da imunidade inata. No entanto, formas infectivas tripomastigotas são resistentes à ação do complemento e essa resistência se relaciona com a expressão de proteínas na superfície do parasita (NOGUEIRA; BIANCO; COHN, 1975).

Estudos experimentais demonstram que os anticorpos constituem componentes importantes nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra *T. cruzi* (KIERZENBAUM; HOWARD, 1976; KRETTLI; BRENER, 1976). Em 1982, Krettli e Brener introduziram a idéia de anticorpos líticos. Eles verificaram existir uma dissociação entre os anticorpos envolvidos no diagnóstico da doença de Chagas e os que participavam da resistência contra o parasita. Estes últimos só se ligavam às formas vivas de tripomastigotas, desta maneira a dosagem de anticorpos líticos se tornou uma excelente ferramenta para a avaliação de cura.

As células TCD4 são extremamente importantes na proteção contra a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que são necessárias para a produção de anticorpos líticos e produzem citocinas, como o IFN - γ , que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasita em células infectadas (TARLETON et al., 1996). Por outro lado, a necessidade simultânea de células TCD8 poderia estar relacionada com o fato de que *T. cruzi* é capaz de infectar praticamente qualquer tipo de célula nos diversos tecidos do hospedeiro. Células não linfóides infectadas expressam apenas MHC classe I. Essas células não são reconhecidas por linfócitos TCD4, mas poderiam ser identificadas por células TCD8 efetoras (NOGUEIRA; COHN, 1976; LENZI et al., 1996).

A infecção do hospedeiro pelo *T. cruzi*, quando não tratada, atinge um estágio crônico no qual a replicação do parasita é reduzida e mantida sob controle pelo sistema imune, mas o parasita não é eliminado. Mecanismos efetores da resposta imune, atuando nessa fase da infecção, provocam injúria

tecidual contínua, responsável pelas alterações patológicas observadas na doença de Chagas (LAURIA-PIRES; TEIXEIRA, 1996).

1.3. A importância da pesquisa de vegetais para a descoberta de novas substâncias para o tratamento de doenças tropicais

Desde os primórdios da medicina, substâncias químicas derivadas de plantas, animais e microrganismos são usadas para o tratamento de doenças humanas. O emprego de toxinas naturais e seus derivados têm sido amplamente adotados nas pesquisas de fármacos gerando o desenvolvimento de diversos agentes terapêuticos (TEMPONE et al., 2007).

A pesquisa para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais ou sintéticas, extração, isolamento e purificação de novos compostos, de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas. O uso de plantas com fins terapêuticos remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem despertou para as suas necessidades, começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício. E ainda

hoje, grande parte da população, principalmente a de baixa renda utiliza-se desta técnica como principal recurso para alívio de seus males (DI STASI, 1996).

Entretanto, as plantas utilizadas pela medicina caseira carecem de uma avaliação científica para determinar suas propriedades terapêuticas e efeitos colaterais. Assim, grandes companhias farmacêuticas aumentaram a pesquisa em extratos de plantas para descobrir novas substâncias ativas, tornando os produtos naturais de origem vegetal, uma importante fonte na descoberta de novas drogas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO; FRAGA, 1999; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Nos últimos vinte anos, o número de informações sobre plantas medicinais no Brasil cresceu apenas 8 % anualmente. Isso mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais deveriam ser mais incentivadas (MARIZ et al., 2006).

As doenças tropicais desafiam as pesquisas científicas, pois os medicamentos existentes não possuem uma boa eficácia. As tripanossomíases são doenças de grande importância no Brasil, como é o caso da doença de Chagas e das leishmanioses. Existem alguns medicamentos para o tratamento dessas doenças, mas alguns possuem baixa eficácia e outros apresentam muitos efeitos colaterais, e a cura da doença de Chagas ainda é um desafio para os

pesquisadores, pois seu tratamento durante a fase crônica é de baixa eficácia (FERREIRA, 1990).

Dessa forma a doença de Chagas e as leishmanioses ainda se constituem em importantes enfermidades a serem combatidas. Estudos realizados em vários países incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, México e Colômbia, relatam que muitas espécies vegetais possuem atividade sobre *T. cruzi* (ABE et al., 2002; LUIZE et al., 2005). Nesse sentido as plantas se apresentam como uma das direções promissoras na busca de drogas eficazes na prevenção e tratamento da doença (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

1.4. O gênero *Miconia* e a espécie vegetal *Miconia albicans*

A família *Melastomataceae* é considerada uma das mais importantes da flora neotropical, incluindo cerca de 200 gêneros e 5000 espécies; destes, 70 gêneros e 1000 espécies ocorrem no Brasil. *Miconia* é um dos maiores gêneros de *Melastomataceae* do Brasil e suas espécies são comuns em áreas florestais e cerrados (SOUZA; LORENZI, 2005). Do ponto de vista químico, estudos realizados com espécies do gênero *Miconia* possibilitam o isolamento de vários triterpenos ácidos (SPESSOTO et al., 2003; CUNHA et al., 2003) e constata-se que ácido ursólico e oleanólico são os triterpenos de ocorrência frequente em espécies deste gênero.

Um estudo anteriormente realizado por nosso grupo de pesquisa com a espécie *Miconia albicans*, permitiu o isolamento e a identificação estrutural dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico presentes nos extratos brutos dessa espécie vegetal. Estes triterpenos nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, foram ativos contra formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (FERREIRA, 2003; CUNHA et al., 2003).

A mistura destes triterpenos, os compostos isolados e o sal derivado de ácido ursólico também foram avaliados em protocolos *in vitro* e *in vivo* sobre as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Neste estudo, o uso dessas substâncias ocasionou considerável atividade tripanocida em testes *in vitro* sob as formas tripomastigotas de ambas as cepas (CUNHA et al, 2006; FERREIRA et al., 2010). A utilização dessas substâncias na concentração de 2 mg/kg foi capaz de reduzir o número de parasitas circulantes de animais experimentalmente infectados apenas com a cepa Y de *T. cruzi* (CUNHA et al, 2006), não exibindo o mesmo comportamento biológico frente à cepa Bolívia (FERREIRA, 2006).

1.5. Ácido ursólico e ácido oleanólico – duas substâncias naturais com potencial biológico

Ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico, pertencem à classe de compostos triterpenóides e são amplamente distribuídos no reino vegetal e têm sido frequentemente isolados como mistura isomérica (VASCONCELOS et al., 2006). Durante a última década muitos artigos foram publicados, refletindo o

grande interesse e progresso no entendimento destes triterpenóides. Isso inclui o isolamento e purificação de várias plantas, modificações químicas, pesquisas farmacológicas e estudos toxicológicos (LIU, 2005).

Dentre as inúmeras atividades biológicas atribuídas aos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, diferentes estudos relatam a atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (VASCONCELOS et al., 2003; KANG et. al, 2008; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008).

Em 1995, Liu descreveu o sucesso do emprego de ácido oleanólico na China para o tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite aguda e crônica, bem como outras desordens hepáticas. Estes triterpenóides apresentam propriedade hepatoprotetora por meio de diminuição da necrose de células parenquimatosas do fígado, fibrose, prevenção da cirrose crônica e intensificação da regeneração do fígado (JEONG; KIM; HWANG, 2005; SZUSTER-CIESIELSKA; KANDEFER-SZERSZEN, 2005).

Atividades antiparasitárias foram descritas contra espécies de *Plasmodium falciparum* (STEELE et al., 1999), *Trypanosoma sp* (CUNHA et al., 2003; LEITE et al., 2006; HOET et al., 2007) e espécies de *Leishmania* (TORRES-SANTOS et al., 2004). Também têm sido descritos efeitos sobre patógenos periodontais (WANG et al., 2002), atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis* (GUA et al., 2004), potencial atividade antiviral contra HIV (OVESNA et al., 2004) e antifertilidade (CHATTOPADHYAY et al., 2005).

Horiuchi et al. (2007) relataram a atividade antimicrobiana desses triterpenos sobre *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e

estreptococos resistentes à vancomicina. SCALON CUNHA et al. (2007) também observaram a atividade biológica desses triterpenos contra patógenos orais. Nesse estudo, eles verificaram que ácido ursólico e ácido oleanólico foram os triterpenos que apresentaram maior inibição do crescimento de microrganismos como: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguinis*.

Um estudo recente demonstrou que o triterpeno ácido ursólico apresenta, além das inúmeras atividades biológicas já descritas, um potencial anabólico por estimular a diferenciação de osteoblastos contribuindo para formação de tecido ósseo (LEE et al., 2008).

De acordo com Ovesna et al. (2004), os triterpenos ácidos podem atuar em vários estágios no desenvolvimento de tumores, como na inibição da tumorigênese, inibição na promoção do tumor e indução de diferenciação da célula tumoral. Inibem efetivamente a invasão de células tumorais e metástase. São capazes de induzirem a apoptose em células tumorais e de prevenirem a transformação maligna das células normais (NOVOTNY; VACHALKAOVA; BIGGS, 2001). Enfim, ácido ursólico e ácido oleanólico têm potencial para serem usados como adjuvantes na terapia do câncer (DORAI; AGGARWAL, 2004). Um recente trabalho também demonstrou a significativa atividade antitumoral do triterpeno ácido ursólico quando administrado na concentração de 50 mg/ kg (CHINOUE et al., 2007).

Apesar das inúmeras atividades biológicas apresentadas por essas substâncias já descritas na literatura, são necessários mais estudos para o melhor

entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos para que elas possam ser empregadas com segurança e eficácia.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Verificar a dose letal média das substâncias em avaliação (DL₅₀);
- Avaliar a atividade biológica dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico em protocolo *in vivo* em animais experimentalmente infectados com as cepas Y (*T. cruzi* grupo II) e Bolívia (*T. cruzi* grupo I) de *Trypanosoma cruzi* e tratados com cada substância por via oral e intraperitoneal nas concentrações de 20 e 50 mg/kg durante 20 dias;
- Preparar e avaliar a atividade tripanocida do sal derivado do triterpeno ácido ursólico em protocolo *in vivo* em animais experimentalmente infectados sob as mesmas condições descritas acima;
- Avaliar toxicidade aguda dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico através das determinações de aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase, Gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, glicose e bilirrubinas;
- Avaliar o efeito dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico sobre alguns parâmetros da resposta imune, tais como IFN – γ , IL-4 e IL-10.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Princípios éticos na Experimentação Animal

O presente trabalho foi encaminhado para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, sendo aprovado e protocolado (nº.06.1.286.53.0) por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

3.2. Parasito

No presente trabalho foram utilizadas duas cepas com características morfológicas distintas: cepa Y, caracterizada por formas delgadas e macrofagotropismo (PEREIRA DE SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) e cepa Bolívia com característica morfológica de forma larga e tropismo predominante para células musculares e glandulares (FUNAYAMA; PRADO JÚNIOR, 1974).

3.3. Substâncias utilizadas

3.3.1. Ácido ursólico e ácido oleanólico

Devido à grande quantidade de substância utilizada na realização desse trabalho, as substâncias supracitadas foram adquiridas comercialmente (SIGMA).

Figura 1- Estrutura química dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico

3.3.2. Preparação do sal de ácido ursólico.

Visando obter derivado para avaliação em ensaio da atividade tripanocida foi preparado o sal de potássio do ácido ursólico.

Ácido ursólico foi tratado com 2% de solução de KOH em acetona/água (1:1) em temperatura ambiente por 2 horas. Após remoção da acetona por evaporação, a solução aquosa resultante foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20. A eluição foi realizada com metanol, possibilitando a obtenção do sal derivado (KASHIWADA et al., 2000). O produto final da reação foi confirmado através de espectrometria de massas. O espectro foi obtido no

Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto – USP.

Figura 2- Estrutura química do sal derivado de ácido ursólico

3.4. Ensaio Biológicos sobre *Trypanosoma cruzi*

3.4.1. Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀)

As substâncias em análise foram administradas oralmente em dose única partindo-se da concentração de 2000 mg/Kg para grupos de camundongos albinos, machos, linhagem BALB/C, pesando aproximadamente 30g (n=10), previamente deixados em jejum por um período de 12 horas. Após o tratamento, os animais foram observados por um período de 72 horas (ABDEL – BARRY; AL – HAKIEM, 2000; PIRES et al., 2004). A mortalidade para a dose empregada foi observada e, por regressão linear, o valor de DL₅₀ calculado segundo descrito por Litchifield e Wilcoxon (1949).

3.4.2. Grupos experimentais e avaliação da parasitemia

Foram utilizados camundongos albinos, machos, linhagem BALB/C, pesando aproximadamente 25g cada, sendo divididos em 4 grupos por cepa e por via de administração (oral e intraperitoneal) onde foi efetuada a análise da atividade de cada substância, como segue:

- Grupo I - controle negativo – 10 animais foram inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados com o solvente utilizado na preparação das soluções (DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%) para a avaliação do comportamento parasitêmico (n=5) e avaliações histológicas (n=5);
- Grupo II - controle positivo – os animais inoculados com 2×10^4 parasitas foram tratados com Benzonidazol, sendo 10 animais tratados com a dosagem correspondente de 20 mg/kg e 10 com a dosagem de 50 mg/kg de peso corpóreo durante 20 dias, para a avaliação do comportamento parasitêmico (n=5) e avaliações histológicas (n=5);
- Grupo III – grupo controle de tratamento - foram utilizados 05 animais para cada dosagem (20 mg/Kg e 50 mg/Kg de peso corpóreo) e para cada substância a ser testada durante 20 dias;
- Grupo IV - tratamento - após 48h da inoculação intraperitoneal dos parasitas (2×10^4 parasitas), 10 animais foram tratados com cada uma das substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg durante 20 dias, para a avaliação do comportamento parasitêmico (n=5) e avaliações histológicas (n=5).

Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, em sala com temperatura e luminosidade controlada, recebendo água e ração *ad libitum*.

As curvas parasitêmicas foram realizadas por meio da coleta de 5µL de sangue da cauda de cada animal em experimentação, de dois em dois dias, sendo o número de parasitas quantificado de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

3.4.3. Avaliação Histológica

3.4.3.1. Técnica de Dissecção

No pico parasitêmico, cinco animais pertencentes a cada grupo experimental avaliado, foram sacrificados por deslocamento da cervical e após a divulsão da pele foram retirados imediatamente coração e baço, sendo estes órgãos colocados em fixador ALFAC e, após 24 horas, em solução de álcool de 80%.

3.4.3.2. Técnica Histológica

Após fixação, o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Foram realizados cortes de 5 μ m de espessura, corados pela hematoxilina-eosina.

Os tecidos coletados e processados dos animais de cada grupo experimental foram destinados às avaliações histológicas. O parasitismo tecidual foi avaliado através de análise qualitativa, a partir da observação de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi*.

Os cortes foram focalizados em microscópio óptico (Axioskop 40) com objetiva de imersão (1000x), munido de uma câmera para captura de imagem, sendo as imagens projetadas em programa de computador (Axion Vision – 4.6).

3.4.4. Avaliações bioquímicas

Foram realizadas as avaliações do perfil hepatobiliar e da função renal de animais experimentalmente tratados com os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, com o objetivo de verificarmos a interferência das substâncias diretamente no processo patológico da doença.

Grupos de 05 ratos da linhagem Wistar machos pesando aproximadamente 90g, mantidos em gaiolas metabólicas com ração e água ad

libitum, foram avaliados com o objetivo de se verificar possível toxicidade da utilização a curto prazo (20 dias de tratamento) com as substâncias propostas, nas dosagens de 20 e 50mg/Kg/dia, por meio de tratamento por via intraperitoneal.

Foram determinadas, por meio de kits laboratoriais LABTEST e conforme os procedimentos recomendados pelo fabricante, as dosagens séricas de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP), como forma de se visualizar alterações hepáticas. Foram também realizadas a determinação das taxas de glicose e bilirrubinas e para avaliação de possíveis alterações da função renal foram determinadas as dosagens de uréia e creatina. Todas as avaliações bioquímicas foram realizadas em espectrofotômetro Micronal, modelo A285.

3.4.5. Dosagens de IFN- γ , IL-10 e IL- 4

A presença de citocinas nas amostras de plasma dos animais submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo foi avaliada através do ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo sanduíche. Previamente, placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo de captura purificado específico para cada interleucina, que foram reconstituídos com 1 ml de PBS (concentração inicial 720 μ g/ml). Desta solução foram feitas diluições

conforme sugerido pelo kit (R&D systems) para chegar a uma concentração final de 4µg/ml e, desta solução, aplicar 100 µl por poço e incubar as placas “overnight” (20 horas de incubação) à temperatura ambiente. Após incubação a placa foi lavada por três vezes com tampão de lavagem (500 ml de PBS + 250 µl Tween 20) e bloqueada com reagente diluente (100 ml de PBS + 1g de BSA) permanecendo incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente foi realizado o procedimento de lavagem da placa e o padrão reconstituído com reagente diluente para a realização da curva. O volume de 100 µl das amostras de plasma e curva padrão foi adicionado por poço, em duplicata e o sistema incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término desse período o anticorpo de detecção foi preparado e, após o procedimento de lavagem da placa, esse anticorpo foi adicionado à placa que permaneceu incubada por um período de 2 horas.

Em seguida, a placa foi lavada por mais três vezes e a estreptoavidina diluída (1/200) foi adicionada, permanecendo o sistema incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. Após novo procedimento de lavagem, 100 µl de substrato (6 ml de TMB – tetramethylbenzidine - + 6 ml de H₂O₂) foram adicionados nos respectivos poços e a placa incubada por 20 minutos protegida da luz. Após esse período, a reação foi interrompida adicionando-se a solução de parada H₂SO₄ em cada poço. A leitura das absorbâncias foi medida a um comprimento de onda 450 nm em leitor de ELISA (Sunrise – Tecan). A quantificação de citocinas nos sobrenadantes foi

determinada através de obtenção de curva padrão, utilizando citocinas com concentrações conhecidas.

3.4.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos no presente trabalho foram avaliados por testes estatísticos com auxílio do software GraphPad Prism versão 4.0, utilizando-se o método mais adequado para cada tipo de avaliação, visando o processamento dos dados experimentais, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação do sal derivado do ácido ursólico

O derivado sal de potássio do ácido ursólico foi identificado através de espectrometria de massas por eletrospray – cone positivo (Figura 3). O íon em m/z 495 corresponde ao derivado protonado $[M+H]^+$. Os íons em m/z 517 e 533 correspondem ao derivado sal de potássio do ácido ursólico cationizado com sódio $[M+Na]^+$ e com potássio $[M+K]^+$, respectivamente.

Figura 3 - Espectro de massas (eletrospray-cone positivo) do sal de potássio do ácido ursólico

4.2. Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀)

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial em que novas substâncias podem causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar as substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (VALADARES, 2006). A toxicidade aguda corresponde aos efeitos adversos que podem ocorrer de imediato ou em curto período de tempo após a administração de uma dose única ou múltiplas doses de uma substância (WALUM, 1998).

O teste da DL₅₀ foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. A dose letal média pode ser definida como uma única dose de uma substância calculada estatisticamente, que causa a morte de 50% dos animais, sendo expressa em termos de massa da substância por unidade de peso do animal utilizado no ensaio (p.ex. mg/kg) (OLIVER, 1986; WALUM, 1998). Na década de setenta este teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias (KRYSIK; RYDZYNSKI, 1997; STAMMATI, 2005).

Os valores iniciais para determinação de dose letal média (DL₅₀) das amostras avaliadas no presente trabalho foram estabelecidos como 500 e 2000mg/Kg. Entretanto, iniciando as avaliações experimentais com o valor de 2000mg/Kg de cada substância, em dose única por via oral, observamos não haver nenhuma morte dos animais em um período de até 72 horas. Assim, como não foi observada a ocorrência de letalidade, ou quaisquer outros sinais de

toxicidade na dosagem utilizada, constatamos total segurança para utilização das mesmas em ensaios envolvendo animais em uma dose muito mais baixa (20 e 50 mg/Kg/dia).

Astudillo, Rodriguez e Schmeda-Hirschmann (2002) avaliaram a toxicidade aguda do triterpeno ácido oleanólico em camundongo Swiss a partir da administração intraperitoneal do triterpeno em concentrações de 100, 200, 400 e 600 mg/kg. Neste estudo os autores não observaram toxicidade ou mortalidade dos animais avaliados e ainda relatam um efeito gastroprotetor apresentado por essa substância.

Corroborando com nossos resultados, um estudo realizado por Singh et al. (1992) demonstrou previamente que a dose letal média para o triterpeno ácido oleanólico pode ser superior à concentração de 2000 mg/kg em camundongos, uma vez que, conforme também observado no nosso trabalho, essa concentração não determina qualquer efeito tóxico.

Os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, amplamente distribuídos no reino vegetal, são parte integrante da dieta humana e atraem considerável interesse por parte dos pesquisadores por apresentarem potencial biológico e baixa toxicidade (LIU, 2005; NOVOTNY; VACHALKAOVA; BIGGS, 2001; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008).

Uma das características mais importantes dessas substâncias é a sua capacidade antioxidante, assim elas podem ser úteis para o desenvolvimento de cosméticos e novos agentes terapêuticos (LIU, 1995; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008).

4.3. Ensaios biológicos *in vivo* sobre *Trypanosoma cruzi*

4.3.1. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Y de *T. cruzi* (via intraperitoneal – 20 mg/kg)

Figura 4- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

De acordo com a figura acima, verifica-se que as substâncias avaliadas não demonstraram atividade biológica significativa sobre a cepa Y de *T. cruzi* na concentração empregada.

Para os animais infectados e tratados com ácido ursólico, verificou-se o desenvolvimento de uma curva parasitêmica semelhante à apresentada pelo grupo controle negativo. Apesar de esta substância provocar o deslocamento do pico parasitêmico do 7º para o 9º dia, não ocorreu redução significativa do número de formas circulantes do parasita ($p>0.05$) permanecendo em torno de 10%, quando comparada ao controle negativo no pico parasitêmico.

Para o ácido oleanólico, observou-se uma exacerbação da parasitemia para essa cepa ($p>0.05$) apesar do deslocamento do pico parasitêmico para o 9º dia. Após o pico parasitêmico observa-se uma queda brusca no número de parasitas circulantes.

Para os animais tratados com sal de ácido ursólico, verificou-se uma redução do número de formas parasitárias, porém esta não foi significativa ($p>0.05$), permanecendo em torno de 35%, comparada ao controle negativo no pico parasitêmico. Semelhante às demais substâncias, o sal de ácido ursólico provocou o deslocamento do pico parasitêmico para o 9º dia, entretanto, após o pico observa-se uma leve queda da curva parasitêmica e em seguida o número de parasitas se mantém praticamente constante, com posterior queda do mesmo.

4.3.2. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Y de *T. cruzi* (via intraperitoneal – 50 mg/kg)

Figura 5- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Para a concentração de 50 mg/ kg, pode-se observar que as duas substâncias, ácido ursólico e oleanólico, provocaram exacerbação dos níveis parasitários quando comparadas aos controles positivo e negativo. Apesar de deslocarem o pico parasitário para o 9º dia, essas duas substâncias não demonstraram atividade biológica para cepa Y na concentração e na via de

administração empregadas ($p>0.05$). Por outro lado, o sal derivado de ácido ursólico exibiu um comportamento diferente das demais substâncias, ou seja, os animais tratados com o sal potássico não demonstraram exacerbação da parasitemia. O número de formas circulantes do parasita foi reduzido em aproximadamente 44% em relação ao grupo controle negativo ($p>0.05$) e, nesse caso, não houve deslocamento do pico parasitêmico, que permaneceu em torno do 7º dia.

O tratamento pela via intraperitoneal com as três substâncias nas concentrações de 20 e 50 mg/kg não aumentou o tempo de sobrevivência dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* em relação aos animais pertencentes ao grupo controle negativo. Para o grupo controle negativo a morte dos animais ocorreu no 13º e 14º dia e para os animais tratados com as diferentes substâncias, do 11º ao 14º dia.

4.3.3. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg

A avaliação da atividade apresentada pelas substâncias ácido ursólico, ácido oleanólico e sal derivado de ácido ursólico sobre as formas teciduais será apresentada através de imagens histológicas que representam o aspecto geral dos diferentes tecidos avaliados nos grupos experimentais estudados.

Para o tecido cardíaco, de acordo com o que podemos verificar na figura 6, nos grupos tratados com as distintas substâncias nas duas concentrações avaliadas observou-se a presença de ninhos de amastigotas de diferentes tamanhos, com exceção do grupo tratado com ácido ursólico 20 mg. Nos grupos de animais tratados com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50 mg observou-se uma redução de parasitismo dose-dependente (Figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografias das fibras cardíacas de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com

Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

Para o tecido esplênico dos animais infectados pela cepa Y e tratados pela via intraperitoneal com as substâncias em estudo (Figura 7), podemos observar um comportamento de parasitismo tecidual semelhante ao apresentado pelos controles negativos, ou seja, o parasitismo apresentou-se em alta intensidade para os grupos avaliados.

Figura 7 - Fotomicrografias do baço de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

4.3.4. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Bolívia de *T. cruzi* (via intraperitoneal – 20 mg/kg)

Figura 8- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Para a cepa Bolívia (Figura 8) os animais tratados com as três substâncias demonstraram um aumento relevante do número de parasitas quando comparados aos animais dos grupos controles ($p > 0.05$). Para os grupos de animais tratados com ácido ursólico e ácido oleanólico, houve um deslocamento do pico parasitário para o 16º e 19º dia, respectivamente.

4.3.5. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Bolívia de *T. cruzi* (via intraperitoneal – 50 mg/kg)

Figura 9- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com ácido ursólico, oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Semelhante ao que acontece na concentração de 20 mg/kg, para a dosagem de 50 mg/kg, os animais tratados com ácido ursólico e ácido oleanólico, quando comparados aos controles utilizados, demonstraram aumento significativo dos níveis parasitários ($p > 0.05$), e deslocamento do pico parasitário para o 19º dia.

Para o sal derivado de ácido ursólico observamos que houve redução da parasitemia dos animais tratados com essa substância em comparação com o grupo controle negativo. Entretanto, essa redução foi de aproximadamente 16%, o que não foi significativo sobre a cepa Bolívia de *T. cruzi* ($p>0.05$). Após uma pequena elevação da parasitemia, observou-se também um declínio com posterior ascensão da curva parasitêmica.

Como observado para a cepa Y de *T. cruzi*, o tratamento com as substâncias, pela via intraperitoneal, nas concentrações de 20 e 50 mg/kg não aumentou o tempo de sobrevivência dos animais infectados com a cepa Bolívia em relação aos animais do grupo controle negativo, onde a morte sobreveio do 24º até o 27º dia. Nos grupos tratados a morte dos animais ocorreu do 25º até o 30º dia.

4.3.6. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via intraperitoneal com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg

O exame histológico do coração permite visualizar a redução do parasitismo para os animais tratados com benzonidazol. Nos cortes analisados, os grupos infectados e tratados com todas as substâncias nas diferentes concentrações demonstraram a presença de ninhos de amastigotas de diferentes tamanhos e ausência de miocardite (Figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografias das fibras cardíacas de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

O tecido esplênico dos grupos infectados pela cepa Bolívia (Figura 11) e tratados pela via intraperitoneal com os triterpenos ácidos demonstrou

ausência de ninhos de amastigotas nos campos analisados e fotografados. Esse resultado pode estar diretamente relacionado ao fato de ser a cepa Bolívia uma cepa miotrópica apresentando baixo macrófagotropismo o que explicaria a baixa incidência de ninhos de amastigotas neste tecido (RIBEIRO; FERRIOLLI FILHO; BELDA NETO, 1982).

Figura 11 - Fotomicrografias do baço de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido

oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

Desde os estudos iniciais de Chagas, há referências à inoculação de várias espécies animais, como cães e macacos com *Trypanosoma cruzi*, como um meio de estudar a evolução da infecção em diferentes vertebrados. Além dos referidos, têm sido utilizados por diversos pesquisadores outros vertebrados, como coelhos, ratos e camundongos (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

Adotamos o camundongo como modelo experimental pelo seu pequeno porte, facilidade de obtenção e manutenção, suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* e necessidade de menor quantidade de substância para o tratamento. Atualmente existe o predomínio da utilização de camundongos de linhagens isogênicas, com a preocupação de se obter infecções padronizadas garantidas pelo padrão genético, e por esse motivo adotamos camundongos pertencentes à linhagem BALB/C.

A avaliação da parasitemia consiste em um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite diferenciar a fase aguda da fase crônica, monitorar os pacientes e caracterizar as cepas de *T. cruzi* (SOGAYAR; KIPNIS; CURI, 1993).

O perfil da curva parasitêmica apresentado pelos grupos experimentais está de acordo com os dados previamente relatados, onde as amostras de *T. cruzi* com predomínio de formas delgadas apresentam período pré-patente e curva parasitêmica de ascensão e queda rápidas. Já as amostras constituídas por formas largas, mostraram um período pré-patente mais demorado

e curva parasitêmica de ascensão e queda lentas (BRENER; CHIARI, 1963; ANDRADE; CARVALHO; FIGUEIRA, 1970).

Os resultados apresentados em relação ao tratamento de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foram inesperados, uma vez que em estudos anteriormente realizados com o tratamento dos animais infectados com a mesma cepa e tratados com as três substâncias na dosagem de 2,0 mg/Kg/dia, foi observado um efeito terapêutico considerável, reduzindo significativamente os níveis parasitêmicos dos animais tratados e aumentando o tempo de vida médio dos mesmos após o término do tratamento (CUNHA et al., 2006).

Em relação à cepa Bolívia, o comportamento apresentado pelos animais submetidos ao tratamento com as substâncias nas duas concentrações (20 e 50 mg/kg) não foi diferente daquele apresentado quando os animais foram tratados com os mesmos compostos na concentração de 2 mg/kg (FERREIRA, 2006), ou seja, para os três grupos de tratamento houve exacerbação da parasitemia em comparação com o grupo controle negativo.

Diversos estudos demonstram que as cepas de *T. cruzi* diferem em termos epidemiológicos, patogênicos, bioquímicos, imunológicos, resposta ao tratamento, distribuição geográfica, virulência e tropismo tissular (LIMA et al., 1999; PRATA, 2001; CALDAS et al., 2008). Portanto, a diversidade entre as cepas pode explicar a diferença de suscetibilidade observada entre as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* frente aos compostos testados nas concentrações de 20 e 50 mg/kg. O mesmo fenômeno foi observado em estudo anterior, onde os animais infectados

com a cepa Y e tratados com as mesmas substâncias na concentração de 2mg/kg apresentaram significativa redução dos níveis parasitêmicos comparados aos animais infectados com a cepa Bolívia de *T. cruzi* (FERREIRA, 2006).

Dessa forma, os resultados obtidos por nosso grupo indicam uma exacerbação da parasitemia de animais infectados e tratados por via intraperitoneal com os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e sal derivado de ácido ursólico. Essa exacerbação pode ter sido desencadeada por uma modulação inadequada da resposta imune frente às substâncias avaliadas. Essa observação pode ser confirmada em um estudo realizado por Eugui et al. (1994) onde foi relatada a atividade imunomodulatória apresentada por ácido ursólico e ácido oleanólico. Além disso, Marquez-Martin et al. (2006) demonstraram que triterpenos pentacíclicos, que exibem propriedade anti-inflamatória, como ácido oleanólico, participam do processo de modulação da resposta imune de forma dose-dependente.

T. cruzi é capaz de infectar grande número de espécies de mamíferos, incluindo muitos dos animais comuns de laboratório. O camundongo mimetiza a fase aguda característica da doença, com abundância de formas circulantes e teciduais, assim como elevados índices de mortalidade (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

No presente estudo, podemos observar através da visualização das figuras apresentadas anteriormente (Figuras 6 e 10), a maior intensidade de parasitismo no tecido cardíaco tanto para a cepa Y como para cepa Bolívia de *T. cruzi*. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o tecido muscular se

destaca como um dos principais sítios onde *T. cruzi* tem a habilidade de se desenvolver (TARLETON, 2003). A avaliação do parasitismo no tecido esplênico demonstrou maior parasitismo dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, fato que pode estar relacionado com o macrófagotropismo apresentado por essa cepa (COURA, 2005).

Muitos vegetais são investigados na busca de componentes com atividade tripanocida, e uma grande variedade de compostos fitoquímicos têm sido avaliados contra *Trypanosoma cruzi*. Alguns deles apresentam significativa atividade *in vitro* e se destacam como substâncias promissoras para o tratamento e quimioprevenção da doença de Chagas (ABE et al., 2002). Nesse sentido, diversos estudos realizados relatam a atividade *in vitro* de triterpenos como ácido ursólico, ácido oleanólico e derivados contra *T. cruzi* (ABE et al., 2002; CUNHA et al., 2003; CUNHA et al., 2006; LEITE et al., 2006).

Entretanto, apesar dessa grande diversidade de artigos que tratam do aspecto da atividade *in vitro*, pouco se tem avaliado dessas substâncias em modelos experimentais animais. Sobre esse aspecto, é difícil compararmos o real efeito de atividade dessas substâncias em modelos *in vivo* e os efeitos que elas podem determinar sobre o sistema biológico.

4.3.7. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Y de *T. cruzi* (via oral – 20mg/ kg)

Figura 12- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que em relação à atividade do triterpeno ácido ursólico, houve uma redução do número de formas circulantes do parasito de 30% quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0.05$), embora não tenha ocorrido o deslocamento do pico parasitário que permaneceu em torno do 7º dia. Após o pico parasitário observou-se uma redução discreta do número de formas tripomastigotas circulantes.

Para os animais tratados com o triterpeno ácido oleanólico, verificou-se o desenvolvimento de curva parasitêmica semelhante à observada pelo grupo controle negativo. Para esses animais a redução do número de formas do parasito, permaneceu em torno de apenas 4% quando comparado ao grupo controle negativo ($p>0.05$).

A análise de nossos dados revelou uma discreta redução do número de formas circulantes do parasita para os animais infectados e tratados com sal de ácido ursólico, de aproximadamente 14% ($p>0.05$). O pico parasitêmico permanece em torno do 7º dia e após o pico observa-se queda dos níveis parasitêmicos.

A exemplo dos resultados anteriormente relatados, para os grupos de animais infectados e tratados com as substâncias em estudo nas duas concentrações, não foi observado um maior tempo sobrevida em relação aos animais do grupo controle negativo, onde a morte aconteceu do 20º ao 22º dia. Para os grupos de animais submetidos ao tratamento com as substâncias a morte sobreveio no 22º e 23º dia.

4.3.8. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Y de *T. cruzi* (via oral – 50mg/ kg)

Figura 13- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Diferente do que acontece com os animais tratados com a dosagem de 20 mg/ kg pela via oral, na concentração de 50 mg/kg, as três substâncias demonstraram atividade biológica significativa sobre a cepa Y de *T. cruzi*, quando comparadas ao grupo controle negativo.

Os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e o sal derivado de ácido ursólico não deslocaram o pico parasitário (que permaneceu no 7º dia),

entretanto, as três substâncias reduziram de forma significativa o número de tripomastigotas circulantes ($p < 0.01$), sendo que os valores de porcentagem de redução parasitária encontrados foram de 79%, 76% e 68%, respectivamente. Além disso, o tempo de sobrevivência para os animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com ácido ursólico e oleanólico, também foi maior em relação aos animais pertencentes ao grupo controle. Para os animais pertencentes ao grupo controle negativo, a morte ocorreu do 20º ao 22º dia, já para os animais tratados com ácido ursólico e ácido oleanólico, a morte dos mesmos ocorreu do 23º ao 30º dia de tratamento.

Na Tabela 1 estão representados os valores absolutos referentes à redução do número de formas circulantes do parasita ocorrida no pico parasitário dos animais que foram submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo e com o controle positivo empregado, Benzonidazol. De acordo com os valores obtidos observa-se a existência de atividade biológica apresentada por essas substâncias, sendo esta mais significativa na concentração de 50 mg/ kg.

Tabela 1- Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais do grupo tratado comparados ao grupo controle negativo. Inóculo de 20.000 formas tripomastigotas / animal; cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Substâncias administradas	Redução parasitária (%) –	
	20 mg/kg	50 mg/kg
Ácido ursólico	30	79
Ácido oleanólico	04	76
Sal de ác. ursólico	14	68
Benzonidazol	96	98

4.3.9. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg

A figura 14 demonstra os aspectos do parasitismo tecidual apresentado pelos animais infectados pela cepa Y e tratados com as substâncias em estudo. Apesar da nítida redução da parasitemia, observada anteriormente pelos dados apresentados na figura 13, o aspecto tecidual dos diferentes grupos experimentais de tratamento é comparável ao aspecto tecidual apresentado pelo grupo controle negativo, sendo que podemos observar a presença de grande quantidade de ninhos de formas amastigotas para todos os grupos avaliados. Para o grupo de animais tratados com benzonidazol observamos uma redução parasitária dose-dependente nos cortes avaliados.

Figura 14 – Fotomicrografias das fibras cardíacas de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

Na avaliação do tecido esplênico dos grupos de animais infectados com a cepa Y e tratados por via oral não foi possível identificar qualquer

correlação de atividade biológica dose-dependente (Figura 15), sendo observado parasitismo tecidual nos campos analisados em animais submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo na concentração de 50 mg/kg. Os ninhos de amastigotas observados apresentaram, em sua maioria, uma aparente redução de tamanho.

Figura 15 - Fotomicrografias do baço de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benznidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benznidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo

infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

4.3.10. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Bolívia de *T. cruzi* (via oral – 20mg/ kg)

Figura 16- Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

A curva parasitêmica acima nos permite visualizar claramente que as substâncias em estudo demonstraram atividade biológica na concentração de 20 mg/kg, em relação ao grupo controle negativo. A redução do número de formas circulantes do parasita, ocorrida no pico parasitêmico permaneceu em torno de 60% para os animais tratados com ácido ursólico ($p < 0.05$), 40% para os animais tratados com ácido oleanólico ($p > 0.05$) e 21% para os camundongos tratados com o sal derivado de ácido ursólico ($p > 0.05$). Além disso, o tempo de sobrevivência dos animais infectados e tratados com o triterpeno ácido ursólico foi maior em comparação com os animais do grupo controle negativo. Para os animais do grupo controle negativo a morte ocorreu do 21º ao 24º dia e para os animais tratados com ácido ursólico, o período de morte foi do 24º ao 31º dia.

4.3.11. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre a cepa Bolívia de *T. cruzi* (via oral – 50mg/ kg)

Figura 17 - Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via oral com ácido ursólico e oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (Benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Na análise da figura 17, nota-se que o tratamento oral com as substâncias avaliadas na concentração de 50mg/kg não foi capaz de reduzir a parasitemia ($p > 0.05$) nos animais experimentalmente infectados com a cepa Bolívia de *T. cruzi*.

Neste caso, os animais que receberam ácido ursólico e oleanólico diariamente exibiram uma constante ascensão da curva parasitêmica e para os

animais que foram tratados com o sal derivado do triterpeno ácido ursólico, observou-se o desenvolvimento de uma curva parasitêmica semelhante àquela apresentada pelo grupo controle negativo.

O comportamento apresentado pelos animais tratados com as substâncias na concentração de 50 mg/kg foi diferente em relação ao apresentado pelos animais tratados com a menor concentração das mesmas, onde foi observada uma redução do número de formas circulantes do parasita. Entretanto, para esclarecer esse fenômeno, uma avaliação farmacocinética das substâncias seria necessária a fim de se determinar a concentração de substância circulante ativa sobre as formas tripomastigotas.

Na Tabela 2 estão representados os valores absolutos da redução da parasitemia ocorrida no pico parasitêmico dos animais submetidos ao tratamento com cada uma das substâncias em estudo. Pelos valores apresentados, verifica-se a ocorrência de redução parasitária ocasionada pelas substâncias na concentração de 20mg/kg, entretanto, sendo esta significativa apenas para o triterpeno ácido ursólico.

Tabela 2- Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais do grupo tratado comparados ao grupo controle negativo. Inóculo de 20.000 formas tripomastigotas / animal; cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

Substâncias administradas	Redução parasitária (%) –	
	20 mg/kg	50 mg/kg
Ácido ursólico	60	00
Ácido oleanólico	40	00
Sal de ác. ursólico	21	00
Benzonidazol	89	98

Em relação ao tempo de sobrevida dos animais infectados, o tratamento com ácido ursólico, ácido oleanólico e sal derivado de ácido ursólico na concentração de 50 mg/kg não foi capaz de aumentar a sobrevida dos mesmos em relação ao grupo controle negativo. Para os animais do grupo controle negativo a morte aconteceu do 21º ao 24º dia e para os animais tratados, do 24º ao 26º dia.

4.3.12. Avaliação histológica do tecido cardíaco e esplênico de animais infectados com a cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com as substâncias em estudo nas concentrações de 20 e 50 mg/kg

Na análise histológica de distintos cortes (Figura 18), verificou-se a ausência de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, no material apresentado, para os animais tratados com as substâncias ácido ursólico e ácido oleanólico na

concentração de 20mg/Kg. Estes dados confirmam os apresentados na tabela 2, onde os melhores valores de porcentagem de redução parasitária foram observados para os grupos de animais tratados com os triterpenos nessa concentração. Os demais grupos de tratamento apresentam ninhos de amastigotas de diferentes tamanhos.

Figura 18 - Fotomicrografias das fibras cardíacas de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg.

(E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

A análise das fotos do tecido esplênico apresentadas na Figura 19 revela que os cortes analisados de animais tratados com ácido ursólico e oleanólico na concentração de 50mg apresentaram pequenos ninhos de amastigotas.

Figura 19 - Fotomicrografias do baço de camundongos infectados e submetidos ao tratamento com as substâncias em estudo. Notar os ninhos de formas amastigotas indicados pelas setas. (A) grupo controle negativo; (B) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 20mg/kg; (C) grupo infectado e tratado com Benzonidazol 50mg/kg; (D) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 20 mg/kg; (E) grupo infectado e tratado com ácido ursólico 50 mg/kg; (F) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 20 mg/kg; (G) grupo infectado e tratado com ácido oleanólico 50 mg/kg; (H) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 20mg/kg; (I) grupo infectado e tratado com sal de ácido ursólico 50mg/kg. Hematoxilina eosina (1000X).

Os resultados obtidos nas curvas parasitêmicas, onde ocorreu uma exacerbação do número de parasitas sanguíneos, nos leva a aventar a hipótese de um efeito imunossupressor apresentado pelas substâncias em estudo, visto que no trabalho de Cunha et al., 2006, os autores observaram uma redução considerável dos índices parasitêmicos de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com essas substâncias pela via intraperitoneal na concentração de 2mg/Kg/dia. Dessa maneira, com o aumento da concentração (20 e 50 mg/kg) os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico estariam interferindo no desenvolvimento do controle da parasitemia pelo hospedeiro.

Por outro lado, a significativa redução do parasitismo ocasionado em razão do tratamento oral pelo ácido ursólico pode estar baseado no fato de que o nível de absorção da substância pela via intestinal é bem reduzida, fato esse comprovado por Liao et al. (2005) onde os autores avaliaram a farmacocinética do ácido ursólico administrado pela via oral.

Em 2006 Song et al. realizaram um estudo farmacocinético do triterpeno ácido oleanólico em voluntários chineses e verificaram que a concentração máxima plasmática foi em torno de 10 ng/ml e o tempo necessário para atingir a concentração máxima foi de 5,2 horas após a administração de cápsulas contendo 40 mg de ácido oleanólico por via oral indicando, portanto, uma lenta absorção *in vivo* para esta substância. Além disso, a biodisponibilidade absoluta de ácido oleanólico foi extremamente baixa (0,7%) para doses orais de 25 e 50 mg/kg em ratos, podendo esse fato estar relacionado com a baixa absorção gastrointestinal dessa substância (JEONG et al., 2007; XI et al., 2009).

Consequentemente, os melhores resultados obtidos em nosso estudo pela administração dos triterpenos ácidos por via oral podem apresentar um menor efeito sobre o sistema imune, promovendo melhor controle da parasitemia no modelo experimental empregado.

Como descrito anteriormente para a via intraperitoneal, os dados obtidos em relação ao tratamento dos animais pela via oral também demonstraram a diferença de suscetibilidade das cepas frente aos compostos avaliados, ou seja, foi possível verificar uma redução parasitária mais significativa para a cepa Y em relação à cepa Bolívia. Comparando os resultados do presente trabalho com o estudo *in vitro* realizado por nosso grupo de pesquisa em 2006, também observamos um melhor efeito das substâncias ácido ursólico, ácido oleanólico e sal derivado de ácido ursólico sobre as formas tripomastigotas da cepa Y em relação à cepa Bolívia de *T. cruzi* (FERREIRA, 2006; CUNHA et al., 2006; FERREIRA et al., 2010), o que pode indicar uma maior suscetibilidade desta cepa

frente aos compostos avaliados, observada tanto no estudo *in vivo* como no estudo *in vitro*.

Substâncias de origem natural com atividade tripanocida poderiam ser consideradas promissoras, embora em alguns casos, sua utilização seja limitada devido à baixa solubilidade das mesmas (LEITE et al., 2006). A solubilidade dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico em água é reduzida, o que limita a biodisponibilidade desses compostos no organismo. Tal fato motiva os grupos de pesquisadores a se esforçarem na tentativa de promover um aumento da solubilidade desses triterpenos através da síntese de derivados modificados quimicamente (LIU, 2005; XI et al., 2009).

Nesse sentido, um dos objetivos do presente estudo foi realizar a modificação estrutural do triterpeno ácido ursólico visando melhorar a solubilização desse composto e, conseqüentemente, potencializar sua atividade biológica. Entretanto, a redução parasitária alcançada para o sal derivado de ácido ursólico não foi superior à apresentada pelo composto original.

Apesar da predominância do tropismo para um tipo celular específico, observada para cada biodema na fase aguda da infecção, diversos órgãos e tecidos podem estar parasitados por uma mesma cepa (COURA, 2005).

Basicamente, as alterações tissulares predominantes na fase aguda da doença, dependem do tropismo da cepa e do seu potencial de determinar uma reação necrótico-inflamatória nos diversos órgãos, bem como da resposta imunológica que se desencadeia. Deste modo, na infecção com cepas do biodema Tipo I, observa-se, nas fases iniciais, ao redor de 10 dias pós-infecção, predominância do macrofagotropismo, com intensa proliferação e parasitismo de

macrófagos nos centros germinais dos folículos do baço, porém as lesões são disseminadas pelo organismo devido à ampla distribuição de células do sistema fagocítico mononuclear. Entretanto, ao atingir a fase mais avançada da infecção aguda, é evidente o miotropismo, com acentuado parasitismo e lesões inflamatórias do miocárdio. Na infecção aguda com as cepas do biotema Tipo II, as lesões predominantes ocorrem no miocárdio, com acentuado parasitismo das células cardíacas, evoluindo para a destruição dos miócitos parasitados. Em menor grau, há também lesões de músculo esquelético e parasitismo de músculos lisos da parede intestinal. Os macrófagos são raramente parasitados. Na infecção com as cepas de biotema Tipo III há, na fase aguda, nítido miotropismo com lesões necrótico-inflamatórias em miocárdio e em músculo esquelético (COURA, 2005).

Da mesma forma, em nosso estudo, observamos um grande parasitismo de esplenócitos e células cardíacas em animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, em comparação com aqueles infectados pela cepa Bolívia, onde ocorreu maior parasitismo do tecido cardíaco. Para as duas cepas, os tecidos avaliados dos diferentes grupos experimentais apresentaram diferente distribuição de ninhos de amastigotas.

Nos grupos tratados por via oral não foi observada a correlação entre parasitismo tecidual e sanguíneo em todos os grupos, principalmente em relação à cepa Y onde se observou redução parasitária significativa no pico parasitário, com intenso parasitismo tecidual.

Para tanto, independentemente da cepa avaliada e da natureza do mecanismo de atividade biológica da substância em estudo é necessário a

utilização de métodos mais sensíveis para a realização de um estudo mais completo de verificação da eficácia de tratamento em nível tecidual, como *real-time* PCR, métodos enzimáticos, imunohistoquímica, entre outros.

O desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária, de modo geral, pode ocorrer através do estabelecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, investigação de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças, ou através da determinação de alvos específicos identificados em vias metabólicas chave para o parasito (CASTRO; SOEIRO, 2009).

Entretanto, a quimioterapia das doenças parasitárias ainda representa um grande desafio para a indústria farmacêutica. A eficácia de um fármaco muitas vezes se torna limitada pela incapacidade do mesmo em atingir o seu alvo em uma concentração suficiente e por um período adequado. Assim, apenas uma pequena fração do agente antiparasitário é realmente capaz de atingir os patógenos em seus locais específicos, enquanto parte do medicamento permanece sem exercer seu efeito (KAYSER; KIDERLEN, 2003).

O interesse no tratamento da doença de Chagas sempre foi muito grande e ainda hoje se mostra como prioridade, principalmente depois que os principais meios de transmissão da doença foram parcialmente controlados em alguns países da América Latina, restando como desafio tratar milhões de indivíduos já infectados.

4.4. Avaliações bioquímicas

O conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros fisiológicos é critério significativo para a avaliação da homeostase, para a avaliação de modificações induzidas por processos patológicos e para a avaliação dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais (CARVALHO et al., 2009).

Nesse sentido, avaliamos no presente estudo os níveis séricos de alguns parâmetros fisiológicos após o tratamento com os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, a fim de se verificar um possível efeito tóxico apresentado pelas substâncias sobre o sistema hepático, biliar e renal que justificasse o aumento dos níveis parasitêmicos observados. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: as enzimas aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase, Gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina, uréia, creatinina, glicose e bilirrubinas.

4.4.1. Determinação dos níveis de aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT)

As transaminases AST e ALT catalisam a conversão de aspartato e alanina em oxaloacetato e piruvato, respectivamente, e são parâmetros úteis para avaliação da função hepática. Elevações das transaminases ocorrem nas hepatites, cirrose, colestase, pancreatite e com o uso de alguns medicamentos (KAPLAN; PESCE, 2003).

Os valores obtidos da determinação dos níveis séricos de aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores máximos e mínimos, obtidos nos diferentes grupos experimentais, referentes aos níveis séricos de aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT) em animais submetidos ao tratamento com ácido ursólico e ácido oleanólico, nas concentrações diárias de 20 e 50 mg/Kg.

<i>Grupo</i>	<i>AST (U/L)</i>	<i>ALT (U/L)</i>
Ácido Ursólico (20mg/Kg/dia)	53 – 75	37 – 51
Ácido Ursólico (50mg/kg/dia)	42 – 96	30 - 48
Ácido Oleanólico (20mg/kg/dia)	45 – 77	33 – 51
Ácido Oleanólico (50mg/kg/dia)	58 – 101	32 - 56
Controle	48 – 76	35 – 52

Na maioria dos casos podemos observar a coincidência da faixa de valores entre os grupos experimentais avaliados. Apenas para o grupo tratado com as substâncias na dosagem de 50 mg/Kg/dia é que observamos uma pequena exacerbação dos valores obtidos, e mesmo assim para apenas um dos animais tratado, em cada grupo.

Entretanto, quando avaliamos estatisticamente a mediana obtida (Figura 20) em cada grupo experimental em relação ao grupo controle, não observamos valores estatisticamente significativos ($p>0,05$).

Tanto AST como ALT são enzimas séricas cuja elevação dos níveis séricos demonstra algum nível de comprometimento hepático, mesmo possuindo a AST produzida no miocárdio importante papel na contribuição sérica total (AMACHER, 1998; BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000).

Assim, fica claro que as substâncias avaliadas, mesmo nas elevadas concentrações observadas no presente experimento, não promoveram nenhum tipo de comprometimento hepático aos animais.

Figura 20 - Comparação estatística dos valores obtidos para AST (A) e ALT (B) nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett (n = 5; ns = não significativo).

Segundo Jeong (1999) o tratamento com ácido oleanólico em concentrações de 10-100 mg/kg reduziu de forma significativa a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono, evidenciada pela diminuição dos níveis séricos de ALT, sendo este efeito dose-dependente.

Após a indução de dano hepático em ratos, induzido por solventes orgânicos, e posterior tratamento com ácido ursólico, Xiong et al. (2003) observaram a restauração da normalidade dos níveis de AST e ALT dos animais, comprovando o efeito hepatoprotetor dessa substância.

4.4.2. Determinação de gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP)

A Tabela 4 representa os valores correspondentes à dosagem da enzima gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) no soro de ratos *Wistar* machos tratados pelas substâncias em avaliação.

Tabela 4 - Valores mínimos e máximos, obtidos nos diferentes grupos experimentais, referentes aos níveis séricos de gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) em animais submetidos ao tratamento com ácido ursólico e ácido oleanólico, nas concentrações diárias de 20 e 50 mg/Kg.

<i>Grupo</i>	<i>GGT (U/L)</i>	<i>ALP (U/L)</i>
Ácido Ursólico (20mg/Kg/dia)	1 – 9	116 – 228
Ácido Ursólico (50mg/kg/dia)	3 – 12	132 – 281
Ácido Oleanólico (20mg/kg/dia)	1 – 10	127 -295
Ácido Oleanólico (50mg/kg/dia)	6 – 14	130 – 315
Controle	1 – 8	108 – 327

Pelos resultados obtidos na dosagem de GGT observamos uma pequena elevação dos níveis máximos dos grupos de animais tratados com os triterpenos ácidos na concentração de 50mg/Kg/dia. Para ALP todos os valores obtidos para os grupos tratados se mostraram dentro dos níveis do grupo controle.

A exemplo do ocorrido para AST e ALT, os valores correspondentes à mediana obtida para GGT não apresentam diferença estatisticamente significativa, pois a dispersão observada na Figura 21 retrata apenas um animal de cada grupo apresentando valores alterados para essa enzima.

Figura 21 - Comparação estatística dos valores obtidos para GGT (A) e ALP (B) nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett (n = 5; ns = não significativo).

Saraswat, Visen e Agarwal (2000) avaliaram o efeito do ácido ursólico após a toxicidade induzida por etanol em hepatócitos de ratos, utilizados como um modelo hepático *in vitro*. Nesse estudo os autores observaram que os níveis de AST, ALT e ALP foram restaurados e que o efeito protetor conferido pelo triterpeno ácido ursólico foi dose dependente.

Em 2005, Kim et al. demonstraram o efeito hepatoprotetor de ácido oleanólico (30mg/kg) após toxicidade induzida por tetracloreto de carbono e verificaram uma diminuição dos níveis séricos de AST, ALP e GGT em virtude do tratamento dos animais com este triterpeno.

Tanto a fosfatase alcalina como a gama-glutamil transferase são enzimas relacionadas à fração microssomal e ao sistema biliar. A gama-glutamil transferase é um marcador sensível de doença inflamatória ou lesão hepática e está significativamente elevada nas doenças obstrutivas da via biliar. Essa enzima apresenta maior especificidade que a fosfatase alcalina e a aspartato amino transferase na avaliação de distúrbios hepáticos, pois não se observa elevação de sua atividade sérica na doença óssea e na gravidez como ocorre para a fosfatase alcalina, nem para doenças do músculo esquelético, como observado para a aspartato amino transferase (KAPLAN; PESCE; KAZMIERCZAK, 2003).

Assim, de acordo com os resultados apresentados em nosso estudo não foi constada nenhuma variação significativa para os níveis de fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase determinada pelos ácidos ursólico e oleanólico.

4.4.3. Determinação de uréia e creatinina

Com a finalidade de avaliarmos possíveis alterações da função renal nos grupos de animais tratados com os triterpenos ácidos nas concentrações de 20 e 50 mg/Kg, comparamos os valores séricos obtidos da dosagem de uréia e creatinina.

Assim, os valores obtidos para tais parâmetros estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores séricos mínimos e máximos determinados na dosagem de uréia e creatinina de ratos *Wistar* machos tratados com ácido ursólico e ácido oleanólico nas dosagens de 20 e 50mg/Kg/dia.

<i>Grupo</i>	<i>Uréia (mg/dL)</i>	<i>creatinina (mg/dL)</i>
Ácido Ursólico (20mg/Kg/dia)	41 – 51	0,6 – 0,8
Ácido Ursólico (50mg/kg/dia)	38 – 56	0,4 – 0,7
Ácido Oleanólico (20mg/kg/dia)	37 – 57	0,5 – 0,6
Ácido Oleanólico (50mg/kg/dia)	35 – 60	0,4 – 0,6
Controle	42 – 52	0,6 – 0,8

Apesar da observação de uma maior amplitude entre os valores máximos e mínimos observados para a dosagem de uréia nos grupos tratados com ácido oleanólico e no grupo tratado com ácido ursólico na dosagem de 50 mg/dL, não foi observada variação significativa para esse parâmetro quando comparados os valores médios obtidos dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (Figura 22 A). Para os níveis séricos de creatinina a mesma observação é válida, pois apesar da amplitude de valores ser maior para os grupos tratados, não houve variação significativa entre as suas medianas (Figura 22 B).

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, o estudo realizado por Mapanga et al. (2009) demonstrou que ácido oleanólico na concentração de 60 mg/kg extraído da espécie vegetal *Syzygium cordatum*,

reduziu a concentração plasmática de creatinina em animais diabéticos tratados por via oral durante cinco semanas. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, os autores sugerem que o triterpeno ácido oleanólico pode apresentar efeitos benéficos em casos associados ao comprometimento renal de animais diabéticos.

O efeito nefroprotetor de ácido oleanólico também foi observado através da redução dos níveis de uréia e creatinina no soro de animais tratados por via oral com esse triterpeno nas concentrações de 40-80mg/kg, comparados com animais do grupo controle (CHANDRAGOUDA et al., 2010).

Figura 22 - Comparação estatística dos valores obtidos para uréia (A) e creatinina (B) nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett (n = 5; ns = não significativo).

No caso da uréia, é válido salientar que esse é um dos principais catabólitos dos aminoácidos, produzido no fígado, originada pela ligação de dois grupos amínicos, a partir da degradação de aminoácidos, a uma molécula do dióxido de carbono.

A partir do momento que ocorre a filtração glomerular nos rins a uréia, lançada de forma constante na corrente circulatória, pode sofrer reabsorção parcial, sendo o excedente um dos principais constituintes da excreção urinária.

Já a creatinina é produzida pela utilização da fosfocreatina muscular, onde no momento do exercício muscular ocorre defosforilação das moléculas de fosfocreatina para a obtenção de energia. Dessa maneira a molécula de creatina resultante sofre ciclização não enzimática, transformando-se em creatinina. De maneira semelhante à uréia, a creatinina, em situações de normalidade do funcionamento muscular, é constantemente produzida e lançada no sangue, sofrendo filtração em nível renal.

Assim, para ambos metabólitos, um aumento dos seus níveis séricos pode ser resultado advindo de problemas no processo de insuficiência renal, como alteração dos níveis de filtração glomerular, causado por um estado patológico do organismo (BISHOP; DUBEN-ENGELKIRK; FODY, 2000).

4.4.4. Determinação dos níveis de glicose

A determinação do aumento dos níveis séricos de glicose demonstra não só alguma deficiência na produção de insulina causada por processos patológicos no pâncreas, como também condições como a obesidade e uso de determinados tipos de medicamento que podem levar à uma diminuição da sensibilidade à insulina por algumas células, mesmo diante do perfeito funcionamento fisiológico pancreático (KAPLAN; PESCE; KAZMIERCZAK, 2003; RAVEL, 1997).

Dessa forma torna-se importante a avaliação desse parâmetro para determinação de possível toxicidade aguda na avaliação de novos candidatos a fármacos.

A Tabela 6 demonstra os valores máximo e mínimo encontrados para os níveis séricos de glicose de animais tratados com ácido ursólico e oleanólico nas dosagens de 20 e 50mg/Kg/dia.

Tabela 6 - Valores séricos mínimos e máximos determinados na dosagem nos níveis de glicose em ratos *Wistar* machos tratados com ácido ursólico e ácido oleanólico nas dosagens de 20 e 50mg/Kg/dia.

<i>Grupo</i>	<i>Glicose (mg/dL)</i>
Ácido Ursólico (20mg/Kg/dia)	100 – 142
Ácido Ursólico (50mg/kg/dia)	103 – 147
Ácido Oleanólico (20mg/kg/dia)	109 – 149
Ácido Oleanólico (50mg/kg/dia)	108 – 145
Controle	108 – 150

Pelos resultados apresentados observamos que não houve hiperglicemia em nenhum dos grupos avaliados, sendo todos os valores obtidos dentro da faixa de normalidade em relação ao grupo controle ($p>0,05$). Esse fato pode ser melhor visualizado na avaliação da Figura 23.

Figura 23- Comparação estatística dos valores obtidos para glicose nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multicomparativo de Dunnett (n = 5; ns = não significativo).

Estudos recentes demonstram que o triterpeno ácido ursólico apresenta função semelhante à insulina estimulando a captação de glicose pelas células (LEE; THUONG, 2010) e que sua utilização pode ser benéfica na prevenção de complicações diabéticas (JANG et al., 2009).

CUNHA et al. (2008) observaram a atividade hipoglicemiante do extrato hidroalcolólico da espécie vegetal *Leandra Lacunosa*, confirmando assim seu uso na medicina popular, no tratamento do diabetes mellitus. Os autores sugerem que a atividade hipoglicemiante do extrato poderia ocorrer principalmente devido a presença dos constituintes majoritários do extrato, entre eles destaca-se o triterpeno ácido ursólico.

GAO et al. (2009) avaliaram a atividade hipolipidêmica e o efeito hipoglicemiante de ácido oleanólico em ratos com diabetes induzida por aloxano. Após a administração por via oral desse triterpeno nas concentrações de 60 e 100

mg/kg, foi constatada a diminuição dos níveis de glicose, além da redução dos níveis séricos de AST, ALT e ALP. Esses resultados indicam que o tratamento com ácido oleanólico poderia conferir proteção hepática e exibir atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos.

4.4.5. Determinação dos níveis de bilirrubina

Um aumento dos níveis séricos de bilirrubina, além das enzimas hepáticas já avaliadas, pode indicar comprometimento da atividade do fígado ou do conduto biliar. Pode se apresentar na forma de glicorunídeos de bilirrubina, também chamada de bilirrubina direta ou ligada à albumina, chamada de bilirrubina indireta.

A fração ligada à albumina indica produto do catabolismo de hemoglobina devido à degradação de eritrócitos, sendo metabolizada pelo fígado, podendo ser liberada tanto pela via intestinal, na sua grande maioria, como pela via renal. Se essa fração estiver aumentada pode indicar destruição exacerbada de eritrócitos, problemas de sua captação ou transporte pelos hepatócitos ou alteração na conjugação por deficiência ou por competição pela enzima glicuronil-transferase. Caso o aumento dos níveis séricos for de bilirrubina metabolizada pela glicuronil-transferase (direta) as alterações patológicas podem ser interpretadas por dificuldades na eliminação pós-conjugação com as colestases intra ou extra-hepáticas (MILLER; GONÇALVES, 1999; RAVEL, 1997).

Os resultados obtidos para estes parâmetros estão apresentados na Tabela 7 e demonstram não haver elevação significativa dos níveis de bilirrubina

direta e bilirrubina total para os grupos de animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Tabela 7- Valores séricos mínimos e máximos determinados na dosagem nos níveis de bilirrubina direta e bilirrubina total em ratos *Wistar* machos tratados com ácido ursólico e ácido oleanólico nas dosagens de 20 e 50mg/Kg/dia.

<i>Grupo</i>	<i>Bilirrubina direta</i> (mg/dL)	<i>Bilirrubina total</i> (mg/dL)
Ácido Ursólico (20mg/Kg/dia)	0,1 – 0,2	0,2 – 0,4
Ácido Ursólico (50mg/kg/dia)	0,1 – 0,3	0,2 – 0,4
Ácido Oleanólico (20mg/kg/dia)	0,2 – 0,3	0,2 – 0,4
Ácido Oleanólico (50mg/kg/dia)	0,2 – 0,4	0,3 – 0,4
Controle	0,1 – 0,4	0,3 – 0,5

Quando as medianas dos dados foram estatisticamente comparadas entre os grupos tratados e grupo controle pelo teste de Dunnett (Figura 24) observamos valores estatisticamente significantes para o grupo tratado com ácido ursólico na dosagem de 50mg/kg/dia, quando avaliados os níveis de bilirrubina total ($p < 0,05$). Apesar dessa variação significativa, salientamos que os valores se apresentaram, em sua maioria, abaixo dos valores de referência, indicando que essa significância é resultado da hepatoproteção conferida pelo ácido ursólico.

Figura 24- Comparação estatística dos valores obtidos para bilirrubina direta e total nos diferentes grupos experimentais avaliados pelo método multi-comparativo de Dunnett (n = 5; ns = não significativo; significante para $p < 0,05$).

Nossos dados comprovam aqueles obtidos por Saravanan, Viswanathan e Pugalandi (2006) que determinaram o grau de proteção hepática determinada pelo ácido ursólico em ratos que tiveram hepatotoxicidade induzida por etanol. Os autores observaram que a dose de 20mg/Kg/dia, durante 30 dias, garantiu efeitos hepatoprotetores semelhantes ao fármaco silimarina, conhecido

regenerador hepático, retornando os níveis de bilirrubina total e direta aos níveis de normalidade. Já em 2007, Vidya et al. relataram o mesmo efeito para animais que tiveram a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono onde o triterpeno ácido ursólico revelou atividade hepatoprotetora semelhante à atividade apresentada pela droga padrão silimarina.

Martin-Aragón et al. (2001) investigaram o possível efeito protetor de ácido ursólico frente a alterações induzidas por tetracloreto de carbono. Os autores sugeriram que o triterpeno ácido ursólico pode prevenir o início e propagação do processo de peroxidação lipídica através da conjugação de radicais livres com glutathione, contribuindo para o controle do dano oxidativo e proteção tecidual. A inibição da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de glutathione pelo triterpeno ácido oleanólico, parece desempenhar importante papel para o processo de prevenção de lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono (LIU, 1995).

Portanto, o alto caráter hepatoprotetor dessas substâncias, associado à ausência de toxicidade aguda induzida aos animais no presente experimento, baseado nos parâmetros avaliados, nos assegura de que o aumento dos níveis parasitêmicos observado nos diferentes grupos experimentais não está associado ao efeito das substâncias no tecido. Na realidade esses resultados comprovam a observação já realizada para os ensaios de determinação de dose letal (DL_{50}) que comprovaram a utilização segura das substâncias.

4.5. Interferência dos triterpenos na produção de interleucinas

A invasão de diversos tipos celulares, em especial macrófagos, pelo *T. cruzi* inicia uma série de interações que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro. Tipicamente ocorre em macrófagos a secreção da citocina IL-12, que ativa células NK (natural killer) a produzirem a citocina IFN- γ (ALIBERTI et al., 1996). Esta age reciprocamente sobre macrófagos, ativando-os para a atividade microbida (GAZZINELI et al., 1992; ALIBERTI et al., 1996). Em associação ao TNF- α , o IFN- γ produzido por células NK ativa a expressão em macrófagos da enzima óxido nítrico (NO) - sintase e a produção de NO, com atividade tóxica sobre *T. cruzi* (GAZZINELI et al., 1992; MUÑOZ-FERNANDEZ; FERNANDEZ; FRESNO, 1992).

O IFN- γ está associado à resistência do hospedeiro à infecção durante a fase aguda (SILVA et al., 1992; SAMUDIO et al., 1998). Em modelos experimentais, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, a administração de IFN- γ tem efeito protetor, enquanto sua neutralização resulta em aumento da suscetibilidade. A produção dessa citocina, no início da infecção diminui a mortalidade dos animais infectados apesar de não eliminar a infecção (SILVA et al., 1992; MINOPRIO et al., 1993; CARDILLO et al., 1996).

Nas infecções murinas com *T. cruzi*, uma das citocinas mais importantes envolvidas na defesa do hospedeiro é o IFN- γ , considerado um importante ativador de macrófagos através do aumento da habilidade destas células em matar parasitas tais como *T. cruzi in vivo* e *in vitro*, *Trypanosoma*

brucei, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium sp* (SONNENFELD; MERIGAN, 1979). No caso de *T. cruzi* IFN- γ tem sido apontado como um inibidor do desenvolvimento parasitário dentro das células do hospedeiro *in vitro* (PLATA et al., 1984; WIRTH et al., 1985) e os indutores de IFN- γ (JAMES et al., 1982) podem diminuir a parasitemia e aumentar a longevidade de camundongos infectados.

Esses trabalhos indiretamente justificam os nossos resultados onde os animais tratados com os triterpenos ácido ursólico e oleanólico apresentaram uma diminuição significativa nas concentrações de IFN- γ (Figura 25), justificando o aumento exacerbado da parasitemia observada nestes grupos de animais tratados.

Estes resultados parecem estar de acordo com o estudo de Ahmad et al. (2006), onde os autores verificaram que o triterpeno ácido ursólico exerceu um efeito inibitório dose dependente sobre a produção de IFN- γ em animais com artrite induzida tratados por via oral.

Um trabalho mais recente também demonstrou que o triterpeno ácido oleanólico administrado intraperitonealmente na concentração de 0,5 mg/kg foi capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e de estimular, por outro lado, a produção de IL-10 (NATARAJU et al., 2009).

Figura 25 - Dosagem de IFN- γ expressa em pg/ml em camundongos Balb/c machos não infectados e infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento no 7º dia de experimento. Grupo CI (machos infectados e não tratados), grupo CNI (machos não infectados e não tratados), grupo TAU (machos infectados e tratados com ácido ursólico 20 mg/kg), grupo TAO (machos infectados e tratados com ácido oleanólico 20mg/kg), grupo CTAU (machos não infectados e tratados com ácido ursólico 20 mg/kg) e grupo CTAO (machos não infectados e tratados com ácido oleanólico 20 mg/kg). Avaliação estatística realizada pelo método One-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni para amostras em relação ao controle infectado (***) $p < 0,001$).

Dessa forma, o estudo do comportamento da curva parasitêmica nos animais infectados e tratados com os triterpenos nos leva a crer que a ação dessas drogas direcionou a resposta imune do hospedeiro para o tipo TH2. E esta hipótese pode ser demonstrada através dos dados obtidos na dosagem de IL-10, em virtude do aumento significativo das concentrações desta citocina (Figura 26).

Martín et al. (2010) também observaram aumento dos níveis séricos de IL-10 após o tratamento com ácido oleanólico na concentração de 50 mg/kg por

via intraperitoneal, de animais que apresentavam esclerose múltipla. Nesse estudo os autores ainda relatam os efeitos benéficos de ácido oleanólico em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , que são essenciais para a progressão da doença.

Fi

gura 26 - Dosagem de IL-10 expressa em pg/ml em camundongos Balb/c machos não infectados e infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento no 7º dia de experimento. Grupo CI (machos infectados e não tratados), grupo CNI (machos não infectados e não tratados), grupo TAU (machos infectados e tratados com ácido ursólico 20 mg/kg), grupo TAO (machos infectados e tratados com ácido oleanólico 20mg/kg), grupo CTAU (machos não infectados e tratados com ácido ursólico 20 mg/kg) e grupo CTAO (machos não infectados e tratados com ácido oleanólico 20 mg/kg). Avaliação estatística realizada pelo método One-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni para amostras em relação ao controle infectado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A produção de IL-10 é necessária para neutralizar os efeitos inflamatórios letais das citocinas tipo I produzidas. Entretanto, diferentes estudos demonstraram a correlação entre maior suscetibilidade de linhagens murinas à infecção chagásica e uma maior produção da citocina antiinflamatória IL-10 (MINOPRIO et al., 1993; REED et al., 1994). Camundongos geneticamente deficientes de IL-10 são capazes de controlar melhor a infecção pelo *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996).

Alguns trabalhos relatam que a IL-10 pode inibir a produção de IFN- γ , bem como os efeitos protetores dessa citocina e que esse fenômeno poderia, portanto, estar relacionado com a exacerbação da infecção (FIORENTINO et al., 1991; SILVA et al., 1992). Dessa forma, a produção aumentada dessa citocina poderia neutralizar os efeitos benéficos da resposta TH1 durante a infecção.

Estes dados poderiam estar de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e o aumento de IL-10 relacionado à maior suscetibilidade dos animais à infecção por *T. cruzi*.

A importância da IL-4 em determinar a suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* ainda não tem sido completamente esclarecida, mas há evidências de que a secreção aumentada de IL-4 estaria associada ao aumento da suscetibilidade de animais infectados com a cepa Tulahúen de *T. cruzi* (HOFT; LYNCH; KIRCHHOFF, 1993).

Em 2001 Soares et al. verificaram que animais nocaute para IL-4 foram mais resistentes à infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* apresentando

baixos níveis parasitêmicos e menor parasitismo tecidual, além de uma maior produção de IFN- γ .

Em relação à produção de IL-4 (Figura 27) não observamos valores estatisticamente significativos entre os diferentes grupos avaliados para esta citocina ($p > 0.05$).

Figura 27- Dosagem de IL-4 expressa em pg/ml em camundongos Balb/c machos não infectados e infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento no 7º dia de experimento. Grupo CI (machos infectados e não tratados), grupo CNI (machos não infectados e não tratados), grupo TAU (machos infectados e tratados com ácido ursólico 20 mg/kg), grupo TAO (machos infectados e tratados com ácido oleanólico 20mg/kg), grupo CTAU (machos não infectados e tratados com ácido ursólico 20 mg/kg) e grupo CTAO (machos não infectados e tratados com ácido oleanólico 20 mg/kg). Avaliação estatística realizada pelo método One-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni para amostras em relação ao controle infectado.

Vários estudos têm mostrado que o estresse pode comprometer a função imunológica (KHANSARI et al., 1990; SANTOS et al., 2005; SANTOS et

al., 2007), podendo induzir o aumento da produção de IL-10 e suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ (GLASER et al., 1986). De acordo com os resultados obtidos verificamos que as substâncias utilizadas tanto na concentração de 20 como de 50mg ocasionaram uma exacerbação dos níveis parasitêmicos, com diminuição de IFN- γ , aumento de IL-10 e, apesar de não significativo, uma tendência ao aumento de IL-4. Tal fato poderia estar relacionado com o tipo de tratamento utilizado. As injeções intraperitoneais diárias, por 20 dias consecutivos, causa aos animais um estresse muito acentuado. No caso específico de nosso experimento o desconforto da dor das injeções poderia constituir um tipo de estresse envolvido. Isso certamente induz uma elevação significativa dos níveis de corticosterona secretados pelo córtex da adrenal influenciando negativamente no processo de controle da replicação parasitária e conseqüentemente levando ao deslocamento para uma resposta TH-2. No caso de nosso primeiro trabalho onde se utilizou tratamento intraperitoneal com 2mg observou-se uma redução da parasitemia não obstante ao mesmo tipo de tratamento. Isso nos leva a crer que a diferença entre as concentrações utilizadas pode ter sido um fator marcante no direcionamento da resposta imune. Assim uma dose dez vezes maior injetada intraperitonealmente possui maior possibilidade de uma absorção mais rápida e eficaz de forma que os picos de atuação nesse tipo de tratamento induzem altas concentrações sanguíneas e teciduais provavelmente ocasionando uma interferência na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Para finalizar, de acordo com os resultados obtidos, sugerimos um possível efeito imunossupressor apresentado pelos triterpenos ácido ursólico e

ácido oleanólico nas concentrações mais elevadas, diminuindo a magnitude da resposta imune do hospedeiro em controlar a replicação parasitária. Outros trabalhos relatam a atividade imunomodulatória atribuída aos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico (CHIANG et al., 2003; RAPHAEL; KUTTAN, 2003; MARQUEZ-MARTIN et al. 2006), onde os autores demonstraram que triterpenos pentacíclicos, que exibem propriedade anti-inflamatória, podem ser úteis no processo de modulação da resposta imune.

É possível que mecanismos intrínsecos imunológicos estejam envolvidos na interação conjunta com as células do sistema imune, aliado ao fato da susceptibilidade genética diferencial do hospedeiro e da patogenicidade dos biodemas utilizados, gerando uma patologia altamente complexa o que levaria ao encontro de dificuldades para o desenvolvimento de vacinas e imuno-terapias eficientes. Dessa forma estudos futuros serão necessários para melhor se desvendar as possíveis interações farmacocinéticas apresentadas por estas drogas no tratamento da doença de Chagas experimental.

5. CONCLUSÕES

Nas avaliações experimentais de DL₅₀, com a dose de 2000 mg/kg de cada substância, não houve nenhuma morte dos animais em um período de até 72 horas, e assim constatamos segurança para a utilização das mesmas nas concentrações de 20 e 50 mg/kg.

De acordo com os resultados obtidos referentes à avaliação da parasitemia, nós sugerimos a possibilidade de um efeito imunossupressor apresentado pelas substâncias ácido ursólico e ácido oleanólico, visto que não houve uma redução considerável dos índices parasitêmicos de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com essas substâncias pela via intraperitoneal nas concentrações de 20 e 50 mg/kg. Por outro lado, a absorção intestinal reduzida das substâncias administradas por via oral poderia contribuir para um menor efeito sobre o sistema imune, promovendo melhor controle da parasitemia no modelo experimental empregado.

Em relação à cepa Bolívia não observamos atividade biológica para as substâncias administradas pela via intraperitoneal de tratamento, havendo exacerbação da parasitemia em comparação com o grupo controle negativo. Entretanto, observamos uma redução das formas circulantes do parasita em virtude do tratamento oral, sendo esta significativa apenas para os animais tratados com o triterpeno ácido ursólico na concentração de 20 mg/kg. A análise histológica realizada não demonstrou, para todos os grupos experimentais, uma correlação entre o parasitismo sanguíneo e o parasitismo tecidual.

Analisando os dados obtidos na avaliação bioquímica, verificamos que o aumento dos níveis parasitêmicos observados nos diferentes grupos experimentais não está associado ao efeito das substâncias no tecido, em virtude do caráter hepatoprotetor e da ausência de toxicidade aguda induzida.

Em relação à dosagem sérica de interleucinas, observamos que o tratamento com os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico provocou uma diminuição dos níveis plasmáticos de IFN- γ , além de aumentar as concentrações de IL-10. Dessa maneira, o tratamento com essas substâncias estaria direcionando a resposta imune para o padrão Th2. Em consequência desse efeito imunossupressor, uma maior quantidade de formas tripomastigotas pode ser observada na circulação do hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BARRY, J. A.; AL-HAKIEM, M. H. H. Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of *Trigonella foenum-graecum* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 70, p. 65-68, 2000.

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGULAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japan, v. 25, p. 1188-1191, 2002.

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

AHMAD, S. F.; KHAN, B.; BANI, S.; SURI, K. A.; SATTI, A. K.; QAZI, G. N. Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. **Pharmacological Research**, England, v. 53, p. 233-240, 2006.

ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZZINELI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin- 12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, United States, v. 64, p. 1961-1967, 1996.

AMACHER, D. E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, United States, v. 27, p. 119-130, 1998.

ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, v. 18, p. 140-44, 1976.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z.A. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa ao Bay 2502. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v. 19, p. 124-129, 2000.

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gazeta Médica da Bahia**, Brasil, v. 70, p. 123-128, 1970.

ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J. A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, England, v. 54, p. 583-588, 2002.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, Brasil, v. 32, p. 679-688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, Brasil, v. 22, p. 744-759, 1999.

BELDA NETO, F.M.; RIBEIRO, R.D. Composição morfológica de sub-amostras do *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO DA FEDERACION LATINOAMERICANA DE PARASITÓLOGOS, 6ª, 1983, São Paulo. Resumos. São Paulo, 1989. p.9.

BISHOP, M. L.; DUBEN-ENGELKIRK, J. L.; FODY, E. P. Clinical Chemistry-principles, procedures, correlations. 4. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A.C.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E. G.; TONELLI, R. R.; SILBER, A. A. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, England, 2010. In press.

BRENER, Z. Therapeutic activity an criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, v. 4, p. 389-96, 1962.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2000.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brazil, v. 5, p. 220-224, 1963.

CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C. M.; LANA, M.; GUEDES, P. M. M.; BAHIA, M. T. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Research**, Germany, v. 103, p. 413-421, 2008.

CANÇADO J.R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (eds.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p.399-405.

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**, United States, v. 64, p. 128-134, 1996.

CARVALHO, G. D.; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, M. S.; ZANINI, S. F.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, Brasil, v. 56, p. 51-57, 2009.

CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>>. Acesso em: 29 nov. 2009.

CHANDRAGOUDA, R. P.; RAMCHANDRA, B. J.; PUSHPARAJ, K. S.; SNEHA, M.; PRABHAKAR, R. P. Protective effect of oleanolic acid on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. **Phytoterapy Research**, England, v. 24, p. 33-37, 2010.

CHATTOPADHYAY, D.; DUNG DUNG, S.R.; MANDAL, A.B.; MAJUMDER, G.C. A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract. **Contraception**, United States, v. 71, p. 372-378, 2005.

CHIANG, L. C.; NG, L. T.; CHIANG, W.; LIN, C. C. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. **Planta Médica**, Brazil, v. 69, p. 600-604, 2003.

CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; PRADO, M. A. F.; ALVES, R. J.; GALVÃO, L. M. C.; ARAÚJO, F. G. Potencial use of WR6026 as prophylaxis against transfusion transmitted American trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 40, p. 613-615, 1996.

CHINO, I.; LIOLIOS, CH.; MOREAU, D., ROUSSAKIS, CH. Cytotoxic activity of *Origanum dictamnus*. **Fitoterapia**, Brazil, v. 78, p. 342-344, 2007.

COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. v.1. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2005.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 97, p. 3-24, 2002.

CUNHA, W. R.; ARANTES, G. M.; FERREIRA, D. S.; LUCARINI, R.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SIVA FILHO, A. A.; CROTTI, A. E. M.; ARAÚJO, A. R. B. Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, Brazil, v. 79, p. 356-360, 2008.

CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A.; FERREIRA, D. S. A study of trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**, England, v. 20, p. 474-8, 2006.

CUNHA, W.R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, N.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Médica**, Brazil, v. 9, p. 470-2, 2003.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, 1996. p.230.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Brasil, v. 28, p. 81-87, 2006.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, Brasil, v. 23, p. 513-522, 2007.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R, organizador. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 557-593.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 41, p. 193-196, 2008.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas' disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 5, p. 603-12, 2002.

DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, Switzerland, v. 44, p. 880-881, 1988.

DORAI, T. & AGGARWAL, B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer letters**, Ireland, v. 215, p. 129-140, 2004.

ESTANI, S.S. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 59, p. 526-9, 1988.

EUGUI, E. M.; DELUSTRO, B.; ROUHAFZA, S.; ILNICKA, M.; LEE, S. W.; WIHELM, R.; ALISO, A. C. Some antioxidants inhibit, in a co-ordinate fashion, the production of tumor necrosis factor- α , IL- β and IL-6 by human peripheral blood mononuclear cells. **International Immunology**, England, v. 6, p. 409-422, 1994.

FERREIRA, D.S.; Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida de extratos brutos e substâncias isoladas de *Miconia albicans* (MELASTOMATACEAE). Franca: Universidade de Franca, 2003. 56 p.

FERREIRA, D. S. Ácido ursólico e ácido oleanólico como potenciais agentes para o combate de *Trypanosoma cruzi*. 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

FERREIRA, D. S.; ESPERANDIM, V.R.; TOLDO, M. P. A.; SARAIVA, J.; CUNHA, W. R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**, Germany, v. 106, p. 985-989, 2010.

FERREIRA, H.O. O tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com Nifurtimox e Benzonidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 23, p. 209-211, 1990.

FILHO, A. A. F.; CORREIA, E. B.; FILHO, R. B.; VASCONCELOS, M. O.; JANCZUK, D.; MARTINS, C. S. S. Sequência de transmissões não habituais da infecção chagásica em uma mesma família: transfusional para a mãe e congênita para o filho, de cepa de *Trypanosoma cruzi* resistente ao tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 41, p. 73-75, 2008.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W., O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**, United States, v. 146, p. 3444-3451, 1991.

FUNAYAMA, G.K.; PRADO JÚNIOR, J.C. Estudos dos caracteres de uma amostra boliviana do *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 8, p. 75-81, 1974.

GALVÃO DA SILVA, A. P.; JACYSYN, J. F.; ABRAHAMSOHN, I. A. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology**, England, v. 108, p. 230-237, 2003.

GAO, D.; LI, Q.; LI, Y.; LIU, Z.; FAN, Y.; LIU, Z.; ZHAO, H.; LI, J.; HAN, Z. Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from *Ligustrum lucidum* at in alloxan-induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, England, v. 23, p. 1257-1262, 2009.

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**, Germany, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GLASER, R.; RICE, J.; SPEICHER, C. E. STOUT, J. C.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress depresses interferon production by leukocytes concomitant with a decrease in natural killer cell activity. **Behavior Neuroscience**, v. 100, p. 675-678, 1986.

GOLDBAUM, M.; AJIMURA, F.Y.; LITVOC, J.; CARVALHO, S. A.; NETO, J.E. American trypanosomiasis and electrocardiographic alterations Among industrial workers in São Paulo, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 46, p. 299-302, 2004.

GUA, J.Q.; WANG, Y.; FRANZBALU, S.G.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B.N. Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. **Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences**, Germany, v. 59, p. 797-802, 2004.

HOET, S.; PIETERS, L.; MUCCIOLI, G. G.; JIWAN, J. L. H.; OPPERDOES, F. R.; LECLERCQ, J. Q. Antitrypanosomal activity of triterpenoids and sterols from the leaves of *Strychnos spinosa* and related compounds. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.1360-3. 2007.

HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, United States, v. 151, p. 7038-7047, 1993.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japan, v. 30, p. 287-290, 2007.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. 3. Ed. São Carlos: Editora EdUFSCAR, 2003. p.152.

HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAÚJO, F. Interleukin-12 mediated resistance of *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infection and immunity**, United States, v. 64, p. 2381-2386, 1996.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, Germany, v. 52, p. 26-42, 2008.

JAMES, S. L.; KIPNIS, T. L.; SHER, A.; HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. **Infection and Immunity**, v. 35, p. 588-593, 1982.

JANG, S. M.; KIM, M. J.; CHOI, M. S.; KWON, E. Y.; LEE, M. K. Inhibitory effects of ursolic acid on hepatic polyol pathway and glucose production in streptozotocin-induced diabetic mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, United States, 2009. In press.

JANNIN, JEAN.; VILLA, LUIS. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 102, p. 95-97, 2007.

JEONG, D. W.; KIM, Y. H.; KIM, H.H.; JI, H. Y.; YOO, S. D.; CHOI, W. R.; LEE, S. M.; HAN, C. K.; LEE, H. S. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, England, v. 28, p. 51-57, 2007.

JEONG, H. G. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. **Toxicology Letters**, Netherlands, v. 105, p. 215-222, 1999.

JEONG, H. G.; KIM, H. G.; HWANG, Y. P. involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. **Toxicology Letters**, Netherlands, v. 155, p. 369-76, 2005.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. Delivery strategies for antiparasitics. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, England, v. 12, p. 197-207, 2003.

KANG, S.Y.; YOON, S. Y.; ROH, D. H.; JEON, M. J.; SEO, H. S.; UH, D. K.; KWON, Y. B.; KIM, H. W.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; LEE, J. H. The anti-arthritis effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, England, v. 60, p. 1347-54, 2008.

KHANSARI, D. N.; MURGO, A. J.; FAITH, R. E.; Effect stress on the immune system. **Immunology Today**, England, v. 11, p. 170-175, 1990.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J.; KAZMIERCZAK, S. C. Clinical chemistry: theory, analysis and correlation. 4 ed. St. Louis: Mosby, 2003.

KASHIWADA, Y; NAGAU,T; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, Y; OKABE, H. ; COSENTINO, L. M.; LEE, K-H. Anti-AIDS Agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl Ursolic acid derivatives. **Journal of Natural Products**, United States, v. 63, p. 1619-1622, 2000.

KIERZENBAUM, F.; HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **Journal of immunology**, United States, v. 116, p. 755-766, 1976.

KIM, N. Y.; LEE, M. K.; PARK, M. K.; KIM, S. J.; PARK, H. P.; CHO, S. Y.; LEE, J. S. Momordin Ic and oleanolic acid from *Kochiae* fructs reduce carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Medicinal Food**, United States, v. 8, p. 177-183, 2005.

KRETTLI, A. U.; BRENNER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **Journal of immunology**, United States, v. 116, p. 755-760, 1976.

KRETTLI, A. U.; BRENNER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of immunology**, United States, v. 128, p. 2009-2012, 1982.

KRYSIAK, B.; RYDZYNSKI, K. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. **Medycyna Pracy**, Poland, v.48, p. 561-578, 1997.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D.P. Parasitologia humana. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 11, p. 85-108.

LAURIA-PIRES, L.; TEIXEIRA, A. R. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 55, p. 304-310, 1996.

LEE, M. S.; THUONG, P. T. Stimulation of glucose uptake by triterpenoids from *Weigela subsessilis*. **Phytotherapy Research**, England, v. 24, p. 49-53, 2010.

LEE, S. U.; PARK, S. J.; KWARK, H. B; OH, J.; MIN, Y. K.; KIM, S. H. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation *in vitro* and inducing new bone formation *in vivo*. **Pharmacological Research**, England, v. 58, p. 290-296, 2008.

LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; FILHO, J. D. S.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japan, v. 29, p. 2307-2309. 2006.

LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T. GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Experimental parasitology**, United States, v. 84, p. 16-27, 1996.

LIAO, Q.; YANG, W.; JIA, Y.; CHEN, X.; GAO, Q.; BI, K. LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation *Lu-Ying* extract. **Yakugaku Zasshi**, Japan, v. 125, p. 509-515, 2005.

LIMA, V. S.; MANGIA, R. H. R.; CARREIRA, J. C.; MARCHEWSKI, R. S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: correlation of biological aspects of the cycle in mice and Triatomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 94, p. 397-402, 1999.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, United States, v. 96, p. 99-113, 1949.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid (Review). **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 49, p. 57-68, 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 100, p. 92-94, 2005.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G. MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Brazil, v. 41, p. 85-94, 2005.

MAPANGA, R. F.; TUFTS, M. A.; SHODE, F. O.; MUSABAYANE, C. T. Renal effects of plant-derived oleanolic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. **Renal failure**, England, v. 31, p. 481-491, 2009.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRALL, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. O.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 16, p. 372-378, 2006.

MARTIN-ARAGÓN, S.; DE LAS HERAS, B.; SANCHEZ-REUS, M. I.; BENEDI, J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat

hepatocytes. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Germany, v. 53, p. 199-206, 2001.

MARTÍN, R.; CARVALHO-TAVARES, J.; HERNÁNDEZ, M.; ARNÉS, M.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; NIETO, M. L. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role. **Biochemical Pharmacology**, England, v. 79, p. 198-208, 2010.

MARTINI, A.S.; LOPES, R.A.; UTRILLA, L.S.; RIBEIRO, R.D.; REIS, C.C.A. Morphological and morphometric study of the alterations on young mouse parotid gland with subpatent Chagas' disease. **Angewandte Parasitologie**, Germany, v. 27, p. 65-72, 1986.

MARQUEZ-MARTIN, A.; DE LA PUERTA, R.; FERNANDEZ-ARCHE, A.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; YAQOOB, P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomaceoil in human mononuclear cells. **Cytokine**, United States, v. 36, p. 211-217, 2006.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, 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 (Review.) **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, United States, v. 146, p. 601-620, 2007.

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. Laboratório para o clínico. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p.388.
MINOPRIO, P.; EL-CHEIKH, M. C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ dependent. **Journal of Immunology**, United States, v. 151, p. 4200-4208, 1993.

MUÑOZ- FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide- dependent mechanism. **European Journal of Immunology**, Germany, v. 22, p. 301-307, 1992.

NATARAJU, A.; SAINI, D.; RAMACHANDRAN, S.; BENSHOFF, N.; LIU, W.; CHAPMAN, W.; MOHANAKUMAR, T. Oleanolic acid, a plant triterpenoid, significantly improves survival and function of islet allograft. **Transplantation**, United States, v. 88, p. 987-994, 2009.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Medicine**, v.142, p.224-229, 1975.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. A. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 143, p. 1402-1420, 1976.

NOVOTNY, L.; VACHALKAOVA, A.; BIGGS, D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. **Neoplasma**, Slovakia, v. 48, p. 241-246, 2001.

OLIVEIRA, M. F.; NAGÃO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; JÚNIOR, A. S. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista Patologia Tropical**, Brasil, v. 37; p. 209-228, 2008.

OLIVER, J. A. Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies. In: chemicals testing and animal welfare. **The National Chemicals Inspectorate**, Sweden, v. 1, p. 119-142, 1986.

OVESNA, Z., VACHALKOVA, A.; HORVATHOVA, K.; TOTHOVA, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds, Minreview, **Neoplasma**, Slovakia, v. 51, p. 327-333, 2004.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica et Biologica**, Brazil, v. 20, p. 191-208, 1953.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Brasil, v. 23, p. 176-182, 2004.

PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; GARCIA-PONS, F.; FALCOFF, E.; EISEN, H. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. **European Journal of Immunology**, Germany, v. 14, p. 930-935.

PONCE, C. Current situation of Chagas disease in Central America. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 102, p. 41-4, 2007.

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

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, Germany, v. 10, p. 483-489, 2003.

RAVEL, R. Laboratório clínico – aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. p. 616.

REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORISSEY, P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, United States, v. 153, p. 3135-3149, 1994.

RIBEIRO- DOS-SANTOS, R.; RASSI, A.; KÖBERLE, F. Chaga's disease. In: Schonfeld, H., Editor, 1981. Antiparasitic Chemoterapy. S. Karger, Basel, p. 115-134.

RIBEIRO, R. D.; FERRIOLLI FILHO, F.; BELDA NETO, F. M. Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. **Revista Brasileira de Biologia**, Brasil, v. 42, p. 51-4, 1982.

ROJAS, A. R.; VINHÃES, M.; RODRIGUEZ, M.; MONROY, J.; PERSAUD, N.; AZNAR, C.; NÁQUIRA, C.; HIWAT, H.; BENÍTEZ, J. Reunião internacional sobre vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Implementação da iniciativa intergovernamental de vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. (Relatório Técnico). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 38, p. 82-89, 2005.

SANTOS, C. D.; CALDEIRA, J. C.; TOLDO, M. P. A.; PRADO JUNIOR, J. C. *Trypanosoma cruzi*: effects of repetitive stress during the development of experimental infection. **Experimental Parasitology**, United States, v. 110, p. 96-101, 2005.

SANTOS, C. D.; PRADO JUNIOR, J. C.; TOLDO, M. P. A.; LEVY, A. M. A.; FRANCI, C. R.; CALDEIRA, J. C. *Trypanosoma cruzi*: plasma corticosterone after repetitive stress during the acute phase of infection. **Experimental Parasitology**, United States, v. 117, p. 404-410, 2007.

SAMUDIO, M., MONTENEGRO-JAMES, S.; CABRAL, M.; MARTINEZ, J.; ROJAS DE ARIAS, A.; JAMES, M. A. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi* infected children in Paraguay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States, v. 58, p. 119-121, 1998.

SARASWAT, B.; VISEN, P. K. S.; AGARWAL, D. P. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. **Phytotherapy Research**, England, v. 14, p. 163-166, 2000.

SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, Netherlands, v. 78, p. 713-718, 2006 .

SAÚDE- GUIMARÃES, D. A & FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 17, p. 455-465, 2007.

SCALON CUNHA, L. C.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; VINHÓLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G.; FILHO, A. A. S.; CUNHA, W. R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi- synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung**, Germany, v. 62, p. 668-72, 2007.

SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Current Opinion in Immunology**, England, v. 7, p. 34-40, 1995.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PÁDUA, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazil, v. 31, p.111-115, 1998.

SILVA, J. S.; MORRIESSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDRESON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 175, p. 169-174, 1992.

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

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de Saúde Pública**, Brasil, v. 16, p. 35-42, 2000.

SINGH, G.B.; SINGH, S.; BANI, S.; GUPTA, B.D.; BANERJEE, S.K. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, England, v. 44, p. 456-458, 1992.

SOARES, M. B.P.; SILVA-MOTA, K. N.; LIMA, R. S.; BELLINTANI, M. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; SANTOS, R. R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin 4. **The American Journal of Pathology**, United States, v. 159, p. 703-709, 2001.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v. 35, p. 395-398, 1993.

SONNENFELD, G.; MERIGAN, T. C. A regulatory role for interferon in immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v. 33, p. 345-355, 1979.

SONG, M.; HANG, T. J.; WANG, Y.; JIANG, L.; WU, X. L.; ZHANG, Z.; SHEN, J.; ZHANG, Y. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 40, p. 190-196, 2006.

SOUZA, H. M.;PIANETTI, G.M.; BARRETO, O.C.O.P. NONOYAMA, K.; GROLG, M.; CHIARI, E. O emprego da aminoquinolina WR6026 como substituto incolor da violeta de genciana na profilaxia da doença de Chagas transfusional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 35, p. 563-9, 2002.

SOUZA, V. M.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005, p. 640.

SPESSOTO, M.A.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.M.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, Germany, v. 10, p. 606-9, 2003.

STAMMATI, A.; COMBES, R. D.; SLADOWSKI, D.; VAN DER VALK, J.; BLAAUBOER B. J. Thirteenth international workshop on *in vitro* toxicology. **Toxicology In Vitro**, England, v. 19, p. 843-844, 2005.

STEELE, J.C.; WARHURST, D.C.; KIRBY, G.C.; SIMMONDS, M.S. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytotherapy Research**, England, v. 13, p. 115-119, 1999.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KANDEFER-SZERSZEN, M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. **Pharmacological Reports**, Poland, v. 57, p. 588-95, 2005.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends in Parasitology**, England, v.19, p.447-451, 2003.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L. H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both ClassI- and ClassII-restricted T cells in immune resistance and disease. **International Immunology**, England, v.8, p. 13-22, 1996.

TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; PADO, F. O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in Drug Design & Discovery**, United Arab Emirates, v. 4, p. 67-73, 2007.

TORRES-SANTOS, E.C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; CARAUTA, J.P.; FALCAO, C.A.; KAPLAN, M.A.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*, **Phytomedicine**, Germany, v. 11, p. 114-120, 2004.

TREVAN, J. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society**, England, v. 101, p. 483-514, 1927.

URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 94, p. 349-355, 1999.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a era do teste DL₅₀. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Brasil, v. 3, p. 93-98, 2006.

VASCONCELOS, M.A.L.; FERREIRA, D.S.; SILVA, M.L.A.; VENEZIANI, R.C.S.; CUNHA, W.R. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 142, p. 333-335, 2003.

VASCONCELOS, M. A. L.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. Evaluation of the *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, Germany, v. 61, p. 477-482, 2006.

VIDYA, S. M.; KRISHNA, V.; MANJUNATHA, B. K.; MANKANI, K. L.; AHMED, M.; SINGH, S. D. Evaluation of hepatoprotective activity of *Clerodendrum serratum* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, India, v. 45, p. 538-542, 2007.

WALUM, ERIK. Acute oral toxicity. **Environmental Health Perspectives**, United States, v. 106, p. 497-503, 1998.

WANG, Q.; FAN, M.; BIAN, Z.; NIE, M.; CHEN, Z. Extract and identify ingredient from *Ligustrum lucidum* Ait and study its effect to periodontal pathogen. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, China, v. 37, p. 388-90, 2002.

WHO (World Health Organization). Report of the scientific group on Chagas disease. **Report**. Argentina, 2007. Disponível em: <www.who.int/tdr>. Acesso em: 15 dez. 2009.

WIRTH, J.; KIERSZENBAUM, F.; SONNENFELD, G.; ZLOTNIK, A. Enhancing effects of interferon-gamma on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, United States, v. 49, p. 61-66.

XI, J.; CHANG, Q.; CHAN, C. K.; MENG, Z. Y.; WANG, G. N.; SUN, J. B.; WANG, Y. T.; TONG, H. H. Y.; ZHENG, Y. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. **AAPS PharmSciTech**, United States, v. 10, p. 172-182, 2009.

XIONG, X.; CHEN, W.; CUI, J.; YI, S.; ZHANG, Z.; LI, K. Effects of ursolic acid on liver-protection and bile secretion. **Zhong Yao Cai**, China, v. 26, p. 578-581, 2003.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, p. 101-107, 2009.