UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial terapêutico e perfil imunológico de
triterpenos ácidos na fase crônica da infecção experimental por
*Trypanosoma cruzi***

Mariana Rosa da Silva

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial terapêutico e perfil imunológico de
triterpenos ácidos na fase crônica da infecção experimental por
*Trypanosoma cruzi***

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.

Orientada: Mariana Rosa da Silva

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ribeirão Preto
2013

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.

Silva, Mariana Rosa da

Avaliação do potencial terapêutico e perfil imunológico de triterpenos ácidos na fase crônica da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2013.

41 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio de.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Ácido ursólico. 3. Ácido oleanólico.
4. Potencial terapêutico. 5. Infecção crônica experimental.
6. Avaliação de substâncias.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Rosa da Silva

Avaliação do potencial terapêutico e perfil imunológico de triterpenos ácidos na fase crônica da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

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: Prof. Dr. 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: _____

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, Célio e Cecília, e à minha irmã Thaís: anjos presentes em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pela oportunidade, ensinamento e paciência.

À Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP - USP, por gentilmente permitir o uso do espectrofotômetro para quantificação de DNA nas amostras utilizadas neste trabalho, e ao pós-graduando Luiz Miguel Pereira, pelas dicas na execução da técnica de Real Time PCR.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura e à pós-graduanda Fernanda Gomes Cardoso, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, pelo auxílio e esclarecimentos necessários para a execução da técnica de Real Time PCR.

Aos funcionários Míriam, Cristiana, Inara e Georgius, pelo auxílio constante, companhia e amizade.

A todos os pós-graduandos do laboratório de Parasitologia da FCFRP - USP, especialmente à Kelly e Mariana Bronzon, pelo auxílio, companhia, amizade e compreensão, em todos os momentos.

À amiga Míriam, pela infinita compreensão e preciosa amizade.

Ao Danilo, pelo sentimento, carinho, apoio, confiança, compreensão e companheirismo, desde o princípio. Palavras não são suficientes para descrever minha gratidão.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

***“É preciso mais coragem para
vencer a si mesmo do que para
vencer os outros”.***

Emmanuel

RESUMO

SILVA, M. R. Avaliação do potencial terapêutico e perfil imunológico de triterpenos ácidos na fase crônica da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. 2013. 41f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

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. A dificuldade do combate a *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença, está intimamente relacionada às interações existentes entre o parasito e o hospedeiro, sendo que até o momento, nenhum medicamento ou substância tem demonstrado real eficácia ao combate ao parasito. Em estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa, os ácidos ursólico e oleanólico demonstraram um bom potencial tripanocida, além de um efeito imunomodulatório, promovendo a inibição da produção de IFN- γ quando de suas utilizações por via intraperitoneal em elevadas concentrações. Considerando essas evidências encontradas em relação a essas substâncias e os efeitos promovidos no processo de avaliação biológica, propusemos como objetivo avaliar o potencial terapêutico dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico na fase crônica da infecção chagásica e suas associações ao benzonidazol, fármaco referência indicado ao tratamento da parasitose, verificando a possibilidade de geração de benefícios sobre a patogênese da infecção crônica experimental. A quantificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e das citocinas IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α pela técnica de citometria de fluxo, utilizando o kit BD Cytometric Bead Array®, indicaram que essas substâncias não apresentam efeitos imunomodulatórios significativos sobre a resposta Th1 e Th2 nessa fase da doença, na comparação entre grupos infectados e tratados e aquele que recebeu apenas solvente. O parasitismo tecidual determinado por Real Time PCR e as observações realizadas em cortes histológicos, mostraram, respectivamente, baixo número de cópias de DNA de *T. cruzi*, e ausência de ninhos amastigotas, porém, com marcante presença de infiltrado inflamatório em todos os grupos. Assim, os dados obtidos levam à conclusão de que apesar da atividade apresentada pelos triterpenos ácidos em estudo na fase aguda da doença de Chagas, o mesmo não ocorre na fase crônica, como seria desejável para favorecer uma melhora do quadro patológico, mesmo não havendo a cura da doença, considerando as consequências da infecção de longo prazo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Ácido ursólico; Ácido oleanólico; Potencial terapêutico; Infecção crônica experimental; Avaliação de substâncias.

ABSTRACT

SILVA, M. R. Evaluation of therapeutic and immunological potential of acid triterpenes in the chronic phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. 2013. 41f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Chagas disease is a public health problem, with disturbing data about the number of infected people and those who remain at risk of infection. The difficulty of eliminating *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of the disease is closely related to the interactions between the parasite and the host, and until now, no medicine or substance has demonstrated real effectiveness against the parasite. In recent studies by our research group, the ursolic and oleanolic acids revealed considerable trypanocidal activity, and an immunomodulatory effect, promoting the inhibition of IFN- γ with intraperitoneal administration in high concentrations. Considering these evidences and the effects observed during the biological evaluation, our objective was to evaluate the biological potential of the triterpenoids ursolic acid and oleanolic acid in the chronic phase of chagasic infection and their associations to benznidazole, the reference drug indicated for the treatment of this disease, verifying the possibility of benefits on the pathogenesis of experimental chronic infection. Quantification of T CD4⁺ and T CD8⁺ cells and of the cytokines IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α by flow cytometry using the kit BD cytometric Bead Array[®], indicated that these substances do not exhibit significant immunomodulatory effects on Th1 and Th2 responses in this stage of the disease, comparing infected and treated groups and that who received only solvent. The tissue parasitism determined by Real Time PCR and in histological observations showed, respectively, low copy number of *T. cruzi* DNA, and absence of amastigote nests, however, with marked inflammatory infiltration in all groups. Thus, our data lead to the conclusion that despite the activity presented by the triterpene acids studied in the acute phase of Chagas disease, the same does not occur in the chronic phase, as would be desirable to the reduction of the pathological conditions, even if there is no cure of the disease, considering the consequences of long term infection.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Ursolic acid, Oleanolic acid, Therapeutic potential; Experimental chronic infection, Substances evaluation.

RESUMEN

SILVA, M. R. Evaluación del potencial terapéutico y perfil inmunológico de triterpenos ácidos en la fase crónica de la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. 2013. 41f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública, presentando datos preocupantes referentes al número de personas contaminadas y de aquellas que aún siguen expuestas al riesgo de infección. La dificultad del combate al *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de esta enfermedad está íntimamente relacionada a las interacciones existentes entre el parásito y el hospedero. Hasta el momento ningún medicamento o sustancia ha demostrado real eficacia para combatir el parásito. En recientes estudios realizados por nuestro grupo de investigación, los ácidos ursólico y oleanólico demostraron un buen potencial tripanocida, además de un efecto inmunomodulador, promoviendo la inhibición de la producción de IFN- γ en sus utilizaciones vía intraperitoneal en elevadas concentraciones. Considerando esas evidencias encontradas y relacionando esas sustancias y sus efectos en el proceso de evaluación biológica, hemos propuesto como objetivo evaluar el potencial terapéutico de los triterpenos: ácido ursólico y ácido oleanólico en la fase crónica de la infección chagásica y sus asociaciones al benznidazol, fármaco referencia indicado para el tratamiento del parasitismo, verificando la posibilidad de generación de beneficios sobre la patogenia de la infección crónica experimental. La cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, y de las citocinas IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α por la técnica de citometría de flujo, utilizando el kit BD Cytometric Bead Array®, indicaron que esas sustancias no presentan efectos inmunomoduladores significativos sobre la respuesta Th1 y Th2 en esa fase de la enfermedad en comparación entre grupos infectados y tratados y aquel que recibió solamente solvente. El parasitismo tecidual determinado por Real Time PCR y las observaciones realizadas en cortes histológicos mostraron respectivamente bajo número de copias de ADN de *T. cruzi*, y ausencia de nidos de amastigotes, aunque con marcante presencia de infiltrado inflamatorio en todos los grupos. Así, los datos obtenidos llevan a la conclusión de que a pesar de la actividad presentada por los triterpenos ácidos en estudio en la fase aguda de la enfermedad de Chagas, el mismo no ocurre en la fase crónica, como sería deseable para favorecer una mejora en el cuadro patológico, mismo no existiendo aún la cura de la enfermedad, considerando las consecuencias de la infección a largo plazo.

Palabras llave: *Trypanosoma cruzi*; Ácido ursólico; Ácido oleanólico; Potencial terapéutico; Infección crónica experimental; Evaluación de sustancias.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas dos ácidos ursólico e oleanólico.....	5
Figura 2. Comparação da população de linfócitos entre grupos infectados.....	9
Figura 3. Comparação da população de linfócitos T CD4 ⁺ entre grupos infectados e não infectados.....	10
Figura 4. Comparação da população de linfócitos T CD8 ⁺ entre grupos infectados e não infectados.....	11
Figura 5. Quantificação de IL-2 nos grupos infectados e não infectados.....	12
Figura 6. Quantificação de IL-10 nos grupos infectados e não infectados.....	13
Figura 7. Quantificação de IL-12 nos grupos infectados e não infectados.....	14
Figura 8. Quantificação de IFN- γ nos grupos infectados e não infectados.....	15
Figura 9. Quantificação de TNF- α nos grupos infectados e não infectados.....	17
Figura 10. Quantificação número de cópias de DNA de <i>T. cruzi</i> por Real Time PCR no tecido cardíaco de animais infectados.....	18
Figura 11. Quantificação número de cópias de DNA de <i>T. cruzi</i> por Real Time PCR no baço de animais infectados.....	19
Figura 12. Quantificação número de cópias de DNA de <i>T. cruzi</i> por Real Time PCR no fígado de animais infectados.....	20
Figura 13. Fotomicrografias do tecido cardíaco de camundongos Balb/C machos infectados.....	21
Figura 14. Fotomicrografias do fígado de camundongos Balb/C machos infectados.....	22
Figura 15. Fotomicrografias do baço de camundongos Balb/C machos infectados.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1. Conjunto de primers e sonda empregados na detecção de DNA de <i>T. cruzi</i> em amostras de tecidos infectados.....	8
Tabela 2. Análise das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ por citofluorimetria de fluxo. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados.....	10
Tabela 3. Análise das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ por citofluorimetria de fluxo. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados.....	11
Tabela 4. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados na quantificação de IFN- γ	16
Tabela 5. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados na quantificação de TNF- α	17

Lista de Abreviaturas e Siglas

IL-12	Interleucina 12
IFN- γ	Interferon gama
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
DNA	Desoxiribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
mL	Mililitro(s)
μ L	Microlitro(s)
mg	Miligrama(s)
kg	Quilograma(s)
NO	Óxido nítrico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
NK	Células natural killer
IL-2	Interleucina 2
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetraacético)
nM	nanomolar
Ct	Cycle threshold
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
μ m	Micrômetro(s)
AU	Ácido ursólico
AO	Ácido oleanólico
BNZ	Benzonidazol

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3.1. Cepa do parasito.....	5
3.2. Amostras para avaliação biológica.....	5
3.3. Animais e grupos experimentais.....	5
3.4. Administração de ácido ursólico, ácido oleanólico e benzonidazol.....	6
3.5. Coleta de material biológico.....	6
3.6. Análise das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ por citofluorimetria de fluxo.....	6
3.7. Quantificação de citocinas.....	7
3.8. Quantificação dos níveis parasitários por Real Time PCR em tecidos infectados.....	7
3.9. Histologia.....	8
3.10. Análise estatística.....	8
4. RESULTADOS	9
4.1. Análise das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	9
4.2. Quantificação de citocinas.....	12
4.2.1. Quantificação de IL-2.....	12
4.2.2. Quantificação de IL-10.....	13
4.2.3. Quantificação de IL-12.....	14
4.2.4. Quantificação de IFN- γ	15
4.2.5. Quantificação de TNF- α	16

4.3. Quantificação dos níveis parasitários por Real Time PCR em tecidos infectados.....	18
4.3.1. Avaliação da carga parasitária no coração.....	18
4.3.2. Avaliação da carga parasitária no baço.....	19
4.3.3. Avaliação da carga parasitária no fígado.....	20
4.4. Histologia.....	21
4.4.1. Tecido cardíaco.....	21
4.4.2. Fígado.....	22
4.4.3. Baço.....	24
 5. DISCUSSÃO.....	 29
 6. CONCLUSÃO.....	 34
 7. REFERÊNCIAS.....	 35

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), afeta aproximadamente 10 milhões de indivíduos nas Américas Central e do Sul, e mais de 80 milhões correm risco de infecção (COURA; DIAS, 2009). Atualmente, devido às migrações, há também a presença de pessoas infectadas em áreas não endêmicas, como América do Norte, Europa, Japão e Austrália (COURA; VIÑAS, 2010). A fase aguda da doença, na maioria dos casos, é assintomática. Possui como característica a presença de parasitemia patente que tende a desaparecer ou permanecer extremamente baixa à medida que a resposta imune humoral se estabelece. Em média 30% dos pacientes apresentam sintomas após longo período de infecção, sendo mais comuns as formas cardíacas e gastrointestinais (GARCIA et al., 2005; TALVANI et al., 2004). Mesmo com os esforços em combater a transmissão vetorial e a melhoria das condições de vigilância em bancos de sangue, a doença de Chagas é ainda considerada um problema de saúde pública (SOEIRO et al., 2009; ROCHA; TEIXEIRA; RIBEIRO, 2007).

Tanto a fase aguda quanto a fase crônica da doença podem ser sintomáticas ou assintomáticas, o que depende de diversos fatores, tais como a quantidade do inóculo e o tipo da infecção, a cepa infectante e a resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasita (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Inúmeros estudos referentes à resposta imune de hospedeiros portadores da doença de Chagas encontram-se disponíveis permitindo observar a complexidade dos mecanismos imunes frente ao parasita, envolvendo diversas células, citocinas e imunoglobulinas (ALIBERTI et al., 1996). O equilíbrio dessa resposta é importante para evitar a proliferação e alojamento do parasita em diferentes órgãos, e consequentemente os efeitos deletérios para o organismo hospedeiro (JUNQUEIRA et al., 2010). Tanto a sua deficiência quanto a sua exacerbação resultam em quadros patológicos distintos entre pacientes.

Células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos, células dendríticas e monócitos são as primeiras a ter contato com as formas tripomastigotas no início da infecção. Macrófagos fagocitam o parasita e produzem óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO), capazes de eliminar *T.*

cruzi. Além disso, produzem também as citocinas TNF- α e IL-12, as quais ativam células natural killer (NK), que por sua vez produzem IFN- γ , ativando um número ainda maior de macrófagos (JUNQUEIRA et al., 2010; BRENER; GAZZINELLI, 1997; GOLGHER; GAZZINELLI, 2004; MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; FRESNO, 1992).

A IL-12 é responsável por ativar linfócitos T helper (T CD4⁺), que durante a fase aguda apresentam um perfil protetor, típico da resposta Th1, sintetizando em maior quantidade o IFN- γ , contribuindo na ativação de macrófagos. Outra citocina de grande importância é a IL-2, que possui por função ativar linfócitos T citotóxicos (T CD8⁺), na tentativa de eliminar células infectadas em diversos tecidos, e de linfócitos B produtores de IgM e IgG. Na evolução para a fase crônica, a resposta predominante é do tipo Th2, onde linfócitos T CD4⁺ produzem duas citocinas de extrema importância, a IL-10 e IL-4 que possuem como função modular a função inflamatória dos linfócitos T CD4⁺ envolvidos na resposta Th1, bem como ativar linfócitos B para a produção de anticorpos (JUNQUEIRA et al., 2010).

Atualmente o medicamento de escolha é o benzonidazol (BNZ), sendo eficaz para o tratamento na fase aguda da infecção, porém não sendo efetivo na fase crônica. Além disso, esta substância apresenta sérios efeitos colaterais para os pacientes, além de não impedir a progressão da fase crônica da doença (TEIXEIRA et al., 2006).

Os ácidos ursólico (AU) e oleanólico (AO) são triterpenos ácidos amplamente distribuídos em muitas espécies vegetais e possuem diversas ações benéficas já relatadas, tais como hepatoprotetora, antitumoral, benefícios para o sistema cardiovascular (LIU, 2005; LIU, 1995), ação antiinflamatória, anti-hiperlipidêmica (LIU, 1995), e atividade anti-oxidante (YIN; CHAN, 2007). Inúmeros trabalhos relatam também comprovada atividade antiparasitária sobre *Trypanosoma* sp (atividade *in vitro*) (CUNHA et al., 2003, TAKETA et al., 2004), *Plasmodium falciparum* (STEELE et al., 1999) e *Leishmania* (TORRES-SANTOS et al., 2004), entre outras existentes na literatura.

Em modelo de artrite induzida em camundongos Balb/C fêmeas (AHMAD et al., 2006) foi relatada a capacidade imunomodulatória do ácido ursólico sobre a exacerbada resposta Th1 responsável pelos efeitos deletérios da artrite. O autor demonstra que houve diminuição significativa de IFN- γ e TNF- α , proporcional ao

aumento das doses de ácido ursólico administradas por via oral, de 10; 20; 40; 80 e 160 mg/kg, indicando por consequência o efeito benéfico da substância no quadro de artrite.

Estudo recente permitiu observar a influência dessas substâncias sobre formas tripomastigotas sanguíneas e sobre os níveis de citocinas em camundongos Balb/C machos infectados pela cepa Y, principalmente do ácido ursólico quando tratados por via oral e intraperitoneal durante a fase aguda da doença (dados em publicação). Apenas os grupos tratados pela via oral apresentaram efeitos benéficos proporcional à dose administrada, com maior controle parasitário. Desta maneira, sugerimos avaliar o comportamento desses triterpenos na fase crônica da doença utilizando como ferramentas a quantificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, com a avaliação paralela dos efeitos imunomodulatórios dessas substâncias sobre a resposta Th1 e Th2 nessa fase da doença, verificando a possibilidade de geração de benefícios sobre a patogênese da infecção crônica experimental.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Verificar a influência dos diversos tratamentos com os ácidos ursólico e oleanólico em associação ou não ao benzonidazol sobre a resposta imune de camundongos machos Balb/C na fase crônica da doença de Chagas experimental, utilizando os seguintes parâmetros:
 2. Quantificação das interleucinas IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α ;
 3. Avaliação das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por citometria de fluxo;
 4. Quantificação da carga parasitária tecidual no coração, baço e fígado pela técnica de Real Time PCR e da destruição tecidual pela histologia.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepa do parasito

A cepa Y de *T. cruzi*, utilizada neste estudo, foi descrita por Silva e Nussenzweig (1953), sendo mantida através de repiques semanais em camundongos *Swiss*. Esta cepa possui morfologia de formas tripomastigotas predominantemente finas com picos parasitêmicos precoces, tendo como características alta virulência e patogenicia.

3.2. Amostras para avaliação biológica

Foram utilizadas as seguintes substâncias: ácido oleanólico (a), e ácido ursólico (b), cujas estruturas seguem abaixo:

Figura 1. Estruturas químicas dos ácidos ursólico e oleanólico.

3.3. Animais e grupos experimentais

Camundongos machos Balb/C (n=70), com peso aproximado de 30 gramas, foram infectados intraperitonealmente com 15 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) de *T. cruzi*, e divididos em 14 grupos:

animais infectados controle (solvente) (ICS); infectados tratados com ácido ursólico (IAU); infectados tratados com ácido oleanólico (IAO); infectados tratados com ácido ursólico e oleanólico (IAU+AO); infectados tratados com benzonidazol (IBNZ); infectados tratados com benzonidazol e ácido ursólico (IBNZ+AU); infectados tratados com benzonidazol e ácido oleanólico (IBNZ+AO); e os respectivos grupos de animais não infectados: animais não infectados controle (solvente) (NICS); não infectados tratados com ácido ursólico (NIAU); não infectados tratados com ácido oleanólico (NIAO); não infectados tratados com ácido ursólico e oleanólico (NIAU+AO); não infectados tratados com benzonidazol (NIBNZ); não infectados tratados com benzonidazol e ácido ursólico (NIBNZ+AU); não infectados tratados com benzonidazol e ácido oleanólico (NIBNZ+AO). Foram colocados 5 animais por grupo em caixas plásticas, com ração comercial e água *ad libitum*. O uso de animais foi aprovado conforme protocolo nº 09.1.699.53.5, pela Comissão de Ética no Uso de Animais da USP – Campus de Ribeirão Preto.

3.4. Administração de ácido ursólico, ácido oleanólico e benzonidazol

O tratamento foi iniciado no 50º dia de infecção por 30 dias, via oral, na dose de 50 mg/kg/dia de cada uma das substâncias. Todas foram dissolvidas em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) a 14% (FURTADO et al., 2008).

3.5. Coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados, por sobredose anestésica intraperitoneal de tribromoetanol 2,5% (0,1 mL/ 10 g de peso corporal). Após a morte foi coletado cerca de 1,0 mL de sangue em tubo plástico com EDTA para dosagem de citocinas, e uma fração do baço para determinação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

3.6. Análise das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por citofluorimetria de fluxo

Para realização desta análise foram utilizadas células esplênicas, obtidas de porção do baço, removido cirurgicamente e macerado em peneiras de nylon (BD Falcon™ Cell Strainer, 100 µm), em 5 mL de meio de RPMI 1640 (GibcoBR). Foram

utilizados no experimento os anticorpos monoclonais (BD Biosciences Pharmingen, USA) conjugados com FITC (Fluorescein isotiocianate) e PE (r-phicoeritrin), dirigidos contra antígenos de superfície CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente. As células foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo (FACScan-BD, BD Biosciences Pharmingen, USA), sendo analisadas 10.000 células utilizando-se os detectores e canais de células adequados para leitura de cada fluorocromo. As análises dos resultados foram realizadas em software DIVA-BD.

3.7. Quantificação de citocinas

Os níveis de IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α foram determinados por citometria de fluxo, utilizando o BD Cytometric Bead Array (CBA, Mouse/Rat Kit, BD Biosciences Pharmingen, USA), seguindo as instruções do fabricante.

3.8. Quantificação dos níveis parasitários por Real Time PCR em tecidos infectados

O DNA foi extraído das amostras de tecidos infectados através do kit Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitex GmbH, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Os primers utilizados na reação de Real Time PCR, Cruzei 1 e Cruzei 2, amplificam um segmento de 166 pares de base (tabela 1). A sonda Cruzei 3 foi marcada com 5'FAM (6-carboxifluoresceína) e 3'MGB (minor groove binder). A concentração final dos componentes em cada reação de PCR foram 1x TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, USA), 750 nM para cada primer de *T. cruzi* e 250 nM para a sonda de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 10 μ L. A amplificação ocorreu sob as seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 58°C. A amostra foi considerada positiva para *T. cruzi* quando o Ct < 45 (PIRON et al., 2007). O equipamento utilizado foi o Eco Real Time PCR System (Illumina, USA). Como normalizador utilizou-se os primers amplificadores do gene GAPDH (TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents, Life Technologies, USA) a fim de corrigir a quantidade de DNA devido a variações no momento de pesagem do tecido para extração do material genético. O valor de DNA de *T. cruzi* obtido em cada amostra foi dividido pelo valor de DNA de GAPDH da mesma amostra (CENCIG et al., 2011).

Tabela 1. Conjunto de primers e sonda empregados na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de tecidos infectados.

Alvo	Oligonucleotídeo	Sequência ^a (5' – 3')	Posição do nucleotídeo ^b
DNA satélite de <i>T. cruzi</i>	Cruzi 1 (forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	27–46
	Cruzi 2 (reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	172–192
	Cruzi 3 (probe)	CACACACTGGACACCAA	143–159

a R, A/G; S, C/G.

b Posição do nucleotídeo na sequência de DNA satélite (GenBank accession no. AY520036).

3.9. Histologia

Ao término dos tratamentos e após a eutanásia dos animais por sobredose anestésica com tribromoetanol 2,5%, retirou-se o coração, baço e fígado, conservados em formol 10% por 24 horas e a seguir mantidos em álcool 80% até sua inclusão em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos de 5µm de espessura, corados pela hematoxilina-eosina. A observação de possíveis alterações teciduais foi feita em microscópio óptico (Axioskop 40, Zeiss) munido de câmera fotográfica para obtenção de fotomicrografias no aumento de 400 vezes.

3.10. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPad Prism 4, aplicando o método One-Way ANOVA, com o teste complementar de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Entre os animais infectados observou-se que houve diferenças significativas, com maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no grupo IBNZ+AU, quando comparado ao grupo ICS e IBNZ+AO, com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente (figura 2; tabela 2). A comparação entre grupos infectados e não infectados mostrou diferenças significantes para a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ nos animais infectados (figuras 3 e 4; tabela 3). Apenas o grupo IAO mostrou diferença significativa em relação ao seu respectivo grupo não infectado, porém, para a porcentagem de linfócitos T CD8⁺.

Figura 2. Comparação da população de linfócitos entre grupos infectados. Teste estatístico One-Way Anova, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$, listados na Tabela 2. Observar maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no grupo IBNZ+AU, quando comparado ao grupo ICS e IBNZ+AO, com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente. (ICS) animais infectados controle (solvente); (IAU) infectados tratados com ácido ursólico; (IAO) infectados tratados com ácido oleanólico; (IAU+AO) infectados tratados com ácido ursólico e oleanólico; (IBNZ) infectados tratados com benzonidazol; (IBNZ+AU) infectados tratados com benzonidazol e ácido ursólico; (IBNZ+AO) infectados tratados com benzonidazol e ácido oleanólico.

Tabela 2. Análise das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por citofluorimetria de fluxo. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados. Teste estatístico One-Way Anova, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$.

Comparação	Tipo celular	Valor de p
ICS vs IBNZ+AU	CD4	$p < 0,01$
IBNZ+AU vs IBNZ+AO	CD4	$p < 0,05$

Figura 3. Comparação da população de linfócitos T CD4⁺ entre grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way Anova, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$, listados na Tabela 3. Não houve diferenças significantes para a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ nos animais infectados. CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

Figura 4. Comparação da população de linfócitos T CD8⁺ entre grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$, listado na Tabela 3. Apenas o grupo IAO mostrou diferença significativa em relação ao seu respectivo grupo não infectado para a porcentagem de linfócitos T CD8⁺, com $p < 0,01$. (CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

Tabela 3. Análise das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por citofluorimetria de fluxo. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$.

Comparação	Tipo celular	Valor de p
IAU vs IBNZ	CD4	$p < 0,001$
IAU vs IBNZ+AU	CD4	$p < 0,001$
IAU vs IBNZ+AO	CD4	$p < 0,001$
IAO vs IBNZ+AU	CD4	$p < 0,001$
IAU+AO vs IBNZ	CD4	$p < 0,05$
IAU+AO vs IBNZ+AU	CD4	$p < 0,001$
IAO vs NIAO	CD8	$p < 0,01$

4.2. Quantificação de citocinas

4.2.1. Quantificação de IL-2

A citocina IL-2 (figura 5) não apresentou alterações significantes entre grupos infectados e não infectados ($p > 0.05$).

Figura 5. Quantificação de IL-2 nos grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Não houve diferenças significativas entre os grupos comparados. Resultado significativo se $p < 0,05$. (CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

4.2.2. Quantificação de IL-10

A citocina IL-10 (figura 6) não apresentou alterações estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados ($p > 0,05$).

Figura 6. Quantificação de IL-10 nos grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Não houve diferenças significativas entre os grupos comparados. Resultado significativo se $p < 0,05$. (CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

4.2.3. Quantificação de IL-12

A citocina IL-12 (figura 7) não apresentou alterações significantes entre grupos infectados e não infectados ($p > 0,05$).

Figura 7. Quantificação de IL-12 nos grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Não houve diferenças significativas entre os grupos comparados. Resultado significativo se $p < 0,05$. (CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

4.2.4. Quantificação de IFN- γ

O IFN- γ mostrou elevação estatisticamente significativa para os grupos de animais infectados controles, e tratados com AU, AO e combinação de AU + AO, quando comparados aos respectivos grupos não infectados ($p < 0,05$). Os grupos tratados com benzonidazol ou associados ao ácido ursólico ou ao ácido oleanólico, não houve diferenças significativas entre os grupos analisados (figura 8, tabela 4).

Figura 8. Quantificação de IFN- γ nos grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$, listados na Tabela 4. Observar a elevação nos grupos de animais infectados, quando comparados aos respectivos grupos não infectados. Os tratamentos com presença de benzonidazol causaram redução acentuada, principalmente nos animais infectados. (CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

Tabela 4. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados na quantificação de IFN- γ . Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$.

Comparação	Valor de p
ICS vs NICS	$p < 0.001$
ICS vs IAU+AO	$p < 0.001$
ICS vs IBNZ	$p < 0.001$
ICS vs IBNZ+AU	$p < 0.001$
ICS vs IBNZ+AO	$p < 0.001$
IAU vs NIAU	$p < 0.001$
IAU vs IBNZ	$p < 0.001$
IAU vs IBNZ+AU	$p < 0.001$
IAU vs IBNZ+AO	$p < 0.001$
IAO vs NIAO	$p < 0.001$
IAO vs IBNZ	$p < 0.001$
IAO vs IBNZ+AU	$p < 0.001$
IAO vs IBNZ+AO	$p < 0.001$
IAU+AO vs NIAU+AO	$p < 0.001$
IAU+AO vs IBNZ	$p < 0.001$
IAU+AO vs IBNZ+AU	$p < 0.001$
IAU+AO vs IBNZ+AO	$p < 0.001$

4.2.5. Quantificação de TNF- α

Para o TNF- α , somente os tratamentos com AO e BNZ mostraram aumento nos animais infectados, comparando-os com aqueles não infectados (figura 9, tabela 5). Foi possível observar também nos animais infectados tratados com AO que a concentração desta citocina foi maior que naqueles em que houve tratamento combinado com BNZ (figura 9, tabela 5).

Figura 9. Quantificação de TNF- α nos grupos infectados e não infectados. Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$, listados na Tabela 5. (CS) controle (tratamento com solvente); (AU) tratamento com ácido ursólico; (AO) tratamento com ácido oleanólico; (AU+AO) tratamento com ácido ursólico e oleanólico; (BNZ) tratamento com benzonidazol; (BNZ+AU) tratamento com benzonidazol e ácido ursólico; (BNZ+AO) tratamento com benzonidazol e ácido oleanólico.

Tabela 5. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos infectados e não infectados na quantificação de TNF- α . Teste estatístico One-Way ANOVA, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo quando $p < 0,05$.

Comparação	Valor de p
IAO vs NIAO	$p < 0.001$
IAO vs IBNZ+AU	$p < 0.05$
IAO vs IBNZ+AO	$p < 0.001$
IAO vs NIBNZ+AO	$p < 0.001$
IBNZ vs NIBNZ	$p < 0.01$

4.3. Quantificação dos níveis parasitários por Real Time PCR em tecidos infectados

Observamos que nenhuma das substâncias mostrou efeito benéfico sobre a infecção crônica experimental. Somente após o trigésimo quinto ciclo foi possível observar aumento de fluorescência referente à amplificação do DNA alvo dos primers utilizados, significando que o número de cópias de DNA era baixo nas amostras analisadas.

4.3.1. Avaliação da carga parasitária no coração

Figura 10. Quantificação número de cópias de DNA de *T. cruzi* por Real Time PCR no tecido cardíaco de animais infectados. Teste estatístico One-Way Anova, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo se $p < 0,05$. (ICS) animais infectados controle (solvente); (IAU) infectados tratados com ácido ursólico; (IAO) infectados tratados com ácido oleanólico; (IAU+AO) infectados tratados com ácido ursólico e oleanólico; (IBNZ) infectados tratados com benzonidazol; (IBNZ+AU) infectados tratados com benzonidazol e ácido ursólico; (IBNZ+AO) infectados tratados com benzonidazol e ácido oleanólico.

A comparação dos animais que receberam diferentes tratamentos com aqueles que receberam apenas solvente não demonstrou diferença estatística significativa em quaisquer das comparações (figura 10).

4.3.2. Avaliação da carga parasitária no baço

Figura 11. Quantificação número de cópias de DNA de *T. cruzi* por Real Time PCR no baço de animais infectados. Teste estatístico One-Way Anova, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo se $p < 0,05$. (ICS) animais infectados controle (solvente); (IAU) infectados tratados com ácido ursólico; (IAO) infectados tratados com ácido oleanólico; (IAU+AO) infectados tratados com ácido ursólico e oleanólico; (IBNZ) infectados tratados com benzonidazol; (IBNZ+AU) infectados tratados com benzonidazol e ácido ursólico; (IBNZ+AO) infectados tratados com benzonidazol e ácido oleanólico.

A comparação dos animais que receberam diferentes tratamentos com aqueles que receberam apenas solventes não demonstrou diferença estatística significativa em quaisquer das comparações (figura 11).

4.3.3. Avaliação da carga parasitária no fígado

Figura 12. Quantificação número de cópias de DNA de *T. cruzi* por Real Time PCR no fígado de animais infectados. Teste estatístico One-Way Anova, com teste complementar de Tukey. Resultado significativo se $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas ao comparar os diferentes grupos experimentais ao grupo controle, o qual foi tratado apenas com solvente. (ICS) animais infectados controle (solvente); (IAU) infectados tratados com ácido ursólico; (IAO) infectados tratados com ácido oleanólico; (IAU+AO) infectados tratados com ácido ursólico e oleanólico; (IBNZ) infectados tratados com benzonidazol; (IBNZ+AU) infectados tratados com benzonidazol e ácido ursólico; (IBNZ+AO) infectados tratados com benzonidazol e ácido oleanólico.

A comparação dos animais que receberam diferentes tratamentos com aqueles que receberam apenas solventes não demonstrou diferença estatística significativa em quaisquer das comparações (figura 12).

4.4. Histologia

4.4.1. Tecido cardíaco

Figura 13

Figura 13. Fotomicrografias do tecido cardíaco de camundongos Balb/C machos infectados. (A) grupo NICS; (B) grupo ICS; (C) grupo IAU; (D) grupo IAO; (E) grupo IAO+AU; (F) grupo IBNZ; (G) grupo IBNZ+AU; (H) grupo IBNZ+AO. Coloração pela hematoxilina-eosina (400X).

Alterações semelhantes foram observadas em todos os grupos, com marcante presença de infiltrado inflamatório em aglomerados (indicação pelas setas) ou disperso no tecido, e ausência de ninhos amastigotas (Figura 13).

4.4.2. Fígado

Figura 14

Figura 14. Fotomicrografias do fígado de camundongos Balb/C machos infectados. (A) grupo NICS; (B) grupo ICS; (C) grupo IAU; (D) grupo IAO; (E) grupo IAO+AU; (F) grupo IBNZ; (G) grupo IBNZ+AU; (H) grupo IBNZ+AO. Coloração pela hematoxilina-eosina (400X).

Alterações semelhantes foram observadas em todos os grupos, com marcante presença de infiltrado inflamatório em aglomerados (indicação pelas setas) ou disperso no tecido, e ausência de ninhos amastigotas (Figura 14).

4.4.3. Baço

Figura 15

Figura 15

Figura 15

Figura 15. Fotomicrografias do baço de camundongos Balb/C machos infectados. (A) grupo NICS; (B) grupo ICS; (C) grupo IAU; (D) grupo IAO; (E) grupo IAO+AU; (F) grupo IBNZ; (G) grupo IBNZ+AU; (H) grupo IBNZ+AO. Coloração pela hematoxilina-eosina (400X).

Alterações semelhantes foram observadas em todos os grupos, com marcante presença de infiltrado inflamatório em aglomerados (indicação pelas setas). Os resultados obtidos pela técnica de Real Time PCR para quantificação da

carga parasitária nos diferentes tecidos analisados de animais tratados com as distintas substâncias, não apresentaram resultados significantes, confirmando os achados já observados por microscopia óptica dos tecidos infectados.

5. DISCUSSÃO

A utilização do benzonidazol como medicamento de escolha no combate à doença de Chagas envolve um longo tratamento com baixa tolerabilidade por parte dos pacientes, motivo pelo qual novos compostos vêm sendo testados almejando uma maneira mais eficaz de controlar essa parasitose, considerada por muitos pesquisadores como a doença tropical mais negligenciada (CLAYTON, 2010).

Atualmente, não raro encontramos na literatura a descrição de substâncias de origem natural com capacidade de ação sobre o sistema imune. Como exemplo temos o ácido oleico, naturalmente encontrado no óleo de oliva participa no processo de imunomodulação, tratamento e prevenção de diversos tipos de doença tais como as cardiovasculares e autoimunes, distúrbios metabólicos, câncer entre outros. Apesar dessas funções, o papel do ácido oleico no processo de imunomodulação ainda é controverso, podendo melhorar a resposta imune associada a uma eliminação com sucesso de patógenos tais como bactérias e fungos através da interferência em diversos componentes do sistema imune como macrófagos, linfócitos e monócitos (SALES-CAMPOS et al., 2013).

Em nosso estudo, a aplicação dos ácidos ursólico e oleanólico como agentes imunomoduladores não induziu o efeito esperado, não ocorrendo alterações estatisticamente significantes nas populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os grupos infectados tratados e o grupo infectado tratado apenas com solvente (ICS). Apesar de estudos demonstrarem a ação imunomodulatória dos ácidos ursólico e oleanólico em outros quadros patológicos (AHMAD et al., 2006), os nossos dados sugerem que estas substâncias não exerceram tal influência na infecção crônica experimental por *T. cruzi*.

Uma hipótese a ser aventada é que durante um processo infeccioso, o recrutamento e migração de leucócitos ao tecido alvo é um passo crucial para o reestabelecimento da homeostase imunológica. Este processo encontra-se na dependência de vários fatores como ativação de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, sendo coordenado por um mosaico de moléculas quimioatrativas denominadas de quimiocinas (SALLUSTO; MACKAY; LANZAVECCHIA, 2000; GERARD; ROLLINS, 2001; MOSER; LOESTSCHER, 2001).

No tocante ao envolvimento das populações celulares sabe-se que as células T CD8⁺ encontram-se em maior número no tecido cardíaco de pacientes chagásicos (HIGUCHI et al., 1993; REIS et al., 1997). Por outro lado, esses pacientes apresentam poucas formas amastigotas e antígenos parasitários no miocárdio, ficando esta condição associada à presença de raras células produtoras de IL-4, porém com alta produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (REIS et al., 1997, DOS SANTOS et al., 2001).

Dessa forma a baixa ação dos ácidos oléicos e ursólico poderiam ser a consequência de uma baixa estimulação do sistema imune visto os animais já estarem em plena fase crônica onde as alterações celulares e histopatológicas se encontram bem estabelecidas. Alguns trabalhos relatam uma diminuição da linfoproliferação na fase crônica da doença de Chagas (HAYES; KIERSZENBAUM, 1981). Esses dados indiretamente corroboram os nossos, visto que na fase crônica da infecção chagásica, a atividade blastogênica das populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ encontrava-se diminuída.

Outro fato relevante que deve ser discutido no que se refere às poucas alterações das populações celulares estudadas é o fato de que as substâncias em questão são pouco absorvidas pelo trato gastrointestinal, e sua biodisponibilidade é baixa (JEONG et al., 2007; XI et al., 2009), limitando assim uma absorção de concentrações adequadas dessas substâncias possivelmente interferindo no potencial de ação imunomodulatório desses compostos.

O efeito imunomodulatório dos ácidos ursólico e oleanólico pode ser observado em doenças distintas, entretanto, há ausência de dados referentes aos efeitos destas substâncias sobre a quantidade de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, dificultando comparar os presentes resultados com os demais trabalhos existentes e avaliar a real atividade desses compostos no modelo experimental utilizado.

A resistência à infecção por *T. cruzi* tem sido associada à produção de certas citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e IFN- γ . Estas citocinas ativam a produção de óxido nítrico pelos macrófagos no sentido de eliminar o parasita (ALIBERTI et al., 1996; TALVANI et al., 2000). TNF- α tem sido associado à ativação de macrófagos como um sinal secundário para a produção de óxido nítrico (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). De forma contrária, citocinas como IL-4 e TGF- β estão

associadas à suscetibilidade ao parasita (RODRIGUES; RIBEIRÃO; BOSCARDIN, 2000; HIYAMA et al., 2001).

Quanto aos níveis plasmáticos de IFN- γ e TNF- α , os animais infectados apresentaram aumento estatisticamente significativo quando comparadas aos animais não infectados. Porém, o tratamento com o ácido oleanólico e/ou ursólico não revelou nenhuma ação imunomodulatória nos animais infectados na comparação dos grupos tratados com o grupo que recebeu apenas solvente, apesar da existência de outras pesquisas que descrevem propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias atribuídas a estas substâncias (CHIANG et al., 2003; MARQUEZ-MARTIN et al., 2006; RAPHAEL; KUTTAN, 2003).

O IFN- γ é uma citocina protetora (FIORENTINO et al., 1991), capaz de reduzir a suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*. Entretanto, sua elevada expressão, em conjunto com TNF- α , está associada à ocorrência de dano cardíaco severo (GOMES et al., 2003; TALVANI et al., 2004). Alguns estudos indicam níveis semelhantes desta citocina ao comparar pacientes sintomáticos e assintomáticos (D'ÁVILA et al., 2009; PEREZ-FUENTES et al., 2008). Porém, outra pesquisa (LAUCELLA et al., 2004) relata correlação oposta entre a expressão de IFN- γ e a manifestação cardíaca. Aspecto diverso foi observado em cães cronicamente infectados e tratados com benzonidazol, nos quais houve redução de lesões cardíacas associadas à baixa expressão de IFN- γ e elevada de IL-10 (DINIZ et al., 2010). É possível que um fino equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias seja relevante no controle da morbidade durante o tratamento da doença de Chagas (DINIZ et al., 2010). Todavia, em função das diferentes respostas imunológicas citadas, não é possível dizer com precisão o quadro estabelecido decorrente dos tratamentos administrados aos grupos experimentais.

Um estudo prévio (REVELLI et al., 1999a) relata níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-10 próximos aos valores encontrados no presente trabalho, utilizando como modelo experimental camundongos infectados pela cepa Tulahuen e sem qualquer tratamento. Desta forma, deve-se considerar a possibilidade de que as concentrações de citocinas encontradas sejam normais da infecção crônica, sem necessariamente ter sofrido alterações devido aos tratamentos administrados.

A associação do benzonidazol em alguns dos grupos experimentais (IBNZ, IBNZ+AU, IBNZ+AO) revelou acentuada redução de IFN- γ e TNF- α , sendo esta

última menos evidente, mas ainda significativa em relação aos demais grupos infectados. O trabalho de Pascuti et al. (2004) descreveu que o benzonidazol apresenta ação supressora na produção de citocinas e na síntese de óxido nítrico, o que explicaria o comportamento anteriormente observado.

Sabe-se que o benzonidazol possui maior poder de ação na fase aguda da doença de Chagas, auxiliando no combate à proliferação do parasita, porém, com a evolução para a fase crônica, sua efetividade torna-se bastante limitada, e os resultados de seu uso no tratamento destes casos variam entre pacientes. Estudos demonstram que animais cronicamente infectados apresentam menores alterações cardíacas quando tratados com esta substância (GARCIA et al., 2005). Em virtude da baixa ação do benzonidazol em atravessar a membrana celular e exercer sua ação nos amastigotas que se encontram alojados por entre células e fibras nos tecidos do hospedeiro, seu efeito supressor e imunomodulatório sobre a produção de citocinas (HYLAND et al., 2007; REVELLI et al., 1999b; PIAGGIO et al., 2001) pode ocorrer, especialmente as pró-inflamatórias, do tipo Th1, evitando uma exacerbação da resposta imune e conseqüentemente diminuindo os danos teciduais comprometedores para o funcionamento normal de diversos órgãos.

Devido às características de cronicidade peculiares da doença de Chagas, técnicas de detecção parasitária como o xenodiagnóstico, parasitemia e a histologia de tecidos infectados estão dando lugar a metodologias mais específicas e sensíveis como, por exemplo, o real time PCR que é uma técnica altamente capaz de detectar a presença de material genético específico, podendo ser empregado em diferentes estudos como método alternativo para monitoramento do curso da infecção em animais submetidos a tratamentos diversos, e também de pacientes portadores da doença (CALDAS et al., 2012; DE FREITAS et al., 2011; CENCIG et al., 2011). Esta técnica utiliza marcadores fluorescentes que permite o acompanhamento constante da amplificação durante a reação de PCR, levando à rápida obtenção de resultados (PIRON et al., 2007).

A fase crônica da infecção por *T. cruzi* tem como característica baixa parasitemia ou total ausência de tripomastigotas circulantes, assim como reduzido número de ninhos de amastigotas nos tecidos do hospedeiro, o que dificulta a observação do parasita pelas técnicas tradicionalmente usadas, anteriormente citadas. Em estudo anteriormente realizado (dados em publicação), verificou-se que o ácido ursólico, na dose de 50 mg/kg/dia via oral em camundongos Balb/C na fase

aguda da infecção pela cepa Y, levou a uma acentuada redução da parasitemia sanguínea, porém, esse efeito não foi observado na análise histopatológica onde o parasitismo tecidual permaneceu, assim como a presença considerável de infiltrado inflamatório, o qual também foi observado nos cortes histológicos obtidos dos animais em fase crônica, em que todos os grupos apresentaram alterações semelhantes ao grupo controle, tratado apenas com solvente, porém, com ausência de ninhos amastigotas.

Do mesmo modo os tratamentos utilizados em nosso experimento aos diferentes grupos experimentais não levaram a mudanças determinantes na resposta imune contra *T. cruzi* na fase crônica da infecção experimental. Dessa forma, a quantificação dos níveis parasitários por Real Time PCR em tecidos infectados não mostraram diferença significativa, como seria desejável para a redução do parasitismo tecidual. Todos os grupos, inclusive aquele que recebeu apenas solvente como tratamento, apresentaram baixo número de cópias de DNA de *T. cruzi*. A pesquisa de Duffy et al. (2013), vem corroborar de forma direta com nossos dados, visto que os autores, estudando a quantificação do parasitismo por Real Time PCR em amostras de sangue de pacientes em fase crônica de infecção chegam a resultados semelhantes aos nossos, sugerindo também que fatores de interferência como a cepa envolvida, resposta imune do hospedeiro neste estágio da doença, poderiam contribuir para o controle da proliferação do parasita, levando à diminuição observada nos níveis de DNA de *T. cruzi* que foi investigado.

6. CONCLUSÃO

Com os presentes dados, os triterpenos ácidos em questão não mostraram evidências de ação benéfica na infecção crônica experimental por *T. cruzi*. Eles não levaram a mudanças determinantes na resposta imune contra o parasita. A quantificação do parasitismo tecidual sugeriu que não houve ação direta sobre o protozoário, sendo possível que os resultados observados sejam decorrentes do estágio da doença em que foram realizados os testes.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental parasitology**, United States, v. 84, n. 2, p. 231-244, Nov. 1996.

AHMAD, S.F.; KHAN, B.; BANI, S.; SURI, K.A.; SATTI, N.K.; QAZI, G.N. Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. **Pharmacological research: the official journal of the italian pharmacological society**, England, v. 53, n. 3, p. 233-240. Mar. 2006.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, 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**, Washington, v. 64, n. 6, p. 1961-1967. Jun. 1996.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and applied immunology**, Switzerland, v. 114, n. 2, p. 103-110. Oct. 1997.

CALDAS, S.; CALDAS, I. S.; DINIZ, L. F.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. P.; CECÍLIO, A. B.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta tropica**, Netherlands, v. 123, n. 3, p.170-177. Sep. 2012.

CENCIG, S., COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. **Plos neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e1216. Jun. 2011.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana - Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* gen. nov. sp. nov., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.1, p. 159-218. 1909.

CHIANG, L. C.; NG, L. T.; CHIANG, W.; CHANG, M. Y.; LIN, C. C. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. **Planta medica**, Stuttgart, v. 69, n. 7, p. 600-604, Jul. 2003.

CLAYTON, J. 2010. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, London, v. 465, n. 7301, p. S12-S15, Jun. 2010.

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

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

COURA, J. R., VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, Outlook: Chagas Disease, London, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, Jun. 2010.

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 medica**, Stuttgart, v. 69, n. 5, p. 470-472. 2003.

D'ÁVILA, D. A.; GUEDES, P. M.; CASTRO, A. M.; GONTIJO, E. D.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 100-105, Fev. 2009.

DINIZ, L. de F., CALDAS, I. S.; GUEDES, P. M.; CREPALDE, G.; LANA, M. de; CARNEIRO, C. M.; TALVANI, A.; URBINA, J. A.; BAHIA, M. T. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 7, p. 2979-2986, Jul. 2010.

DE FREITAS, V. L. T.; da SILVA, S. C. V.; SARTORI, A. M.; BEZERRA, R. C.; WESTPHALEN, E. V. N.; MOLINA, T. D.; TEIXEIRA, A. R. L.; IBRAHIM, K. Y.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4+ level. **Plos neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1277, Aug. 2011.

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

DUFFY, T.; CURA, C. I.; RAMIREZ, J. C.; ABATE, T.; CAYO, N. M.; PARRADO, R.; BELLO, Z. D.; VELAZQUEZ, E.; MUÑOZ-CALDERON, A.; JUIZ, N. A.; BASILE, J.; GARCIA, L.; RIASTE, A.; NASSER, J. R.; OCAMPO, S. B.; YADON, Z. E.;

TORRICO, F.; de NOYA, B. A.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan Probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. **Plos neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e2000, Jan. 2013.

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**, v. 146, n. 10, p. 3444-3451, May. 1991.

FURTADO, R. A.; RODRIGUES, É. P.; ARAÚJO, F. R. R.; OLIVEIRA, W. L.; FURTADO, M. A.; CASTRO, M. B.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. **Toxicologic pathology**, United States, v. 36, n. 4, p. 576-580, Jun. 2008.

GARCIA, S.; RAMOS, C. O.; SENRA, J. F. V.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M. M.; A. CAMPOS-DE-CARVALHO, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, Apr. 2005.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nature immunology**, New York, v. 2, n. 2, p. 108-115, Feb. 2001.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, London, v. 37, n. 5, p. 399-409, Aug. 2004.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and immunity**, United States, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, Mar. 2003.

HAYES, M. M.; KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' Disease: kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and immunity**, United States, v. 31, n. 3, p. 1117-1124. 1981.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial

rejection process. **Virchows archiv. A pathological anatomy and histopathology**, Berlin, v. 423, n. 3, p. 157-160, 1993.

HIYAMA, K.; HAMANO, S.; NAKAMURA, T.; NOMOTO, K.; TADA, I. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology research**, Berlin, v. 87, n. 4, p. 269-274, Apr 2001.

HYLAND, K. V.; LEON, J. S.; DANIELS, M. D.; GIAFIS, N.; WOODS, L. M.; BAHK, T. J.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. **Infection and immunity**, United States, v. 75, n. 7, p. 3641-3650, Jul. 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, n. 2, p. 51-57, Mar. 2007.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, England, v. 12, p. e29, Sep. 2010.

LAUCELLA, S. A.; POSTAN, M.; MARTIN, D.; HUBBY, F. B. ; ALBAREDA, M. C.; ALVAREZ, M. G.; LOCOCO, B.; BARBIERI, G.; VIOTTI, R. J.; TARLETON, R. L. Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 189, n. 5, p. 909-918, Mar. 2004.

LIU, J. Oleanolic and ursolic acid: research perspectives. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 100, n. 1-2, p. 92-94, Aug. 2005.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 49, n. 2, p. 57-68, Dec. 1995.

MARQUEZ-MARTIN, A.; De La PUERTA, R.; FERNANDEZ-ARCHE, A.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; YAQOOB, P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. **Cytokine**, San Diego, v. 36, n. 5-6, p. 211-217, Dec. 2006.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature immunology**, New York, v. 2, n. 2, p. 123-128, Feb. 2001

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 22, n. 2, p. 301-307, Feb. 1992.

PASCUTI, M. F.; PITASHNY, M.; NOCITO, A. L.; GUERMONPREZ, P.; AMIGORENA, S.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E.; BOTTASSO, O.; REVELLI, S. Benznidazole, a drug used in Chagas' disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice. **Life sciences**, Amsterdam, v. 76, n. 6, p. 685-697, Dec. 2004.

PEREZ-FUENTES, R.; TORRES-RASGADO, E.; SALGADO-ROSAS, H.; ZAMORA-GINEZ, I.; SANCHEZ-GUILLEN, M. C. The anti-oxidant defence response in individuals with the indeterminate form of Chagas disease (American trypanosomiasis). **Annals of tropical medicine and parasitology**, London, v. 102, n. 3, p. 189-197, Apr. 2008.

PIAGGIO, E.; ROGGERO, E.; PITASHNY, M.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O. A.; REVELLI, S. S. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Parasitology research**, Berlin, v. 87, n. 7, p. 539-547, Jul. 2001.

PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; PRAT, J. G.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta tropica**, Netherlands, v. 103, n. 3, p. 195-200, Sep. 2007.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 6-7, p. 483-489. 2003.

REIS, M. M.; HIGUCHI, M. L.; BENVENUTI, L. A.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 83, n. 2, p. 165-172, May. 1997.

REVELLI, S.; GÓMEZ, L.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O.; BASOMBRIIO, M. A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, Berlin, v. 85, n. 2, p. 147-150, Feb. 1999a.

REVELLI, S.; LE PAGE, C.; PIAGGIO, E.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 271-277, Nov. 1999b.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of anti-infective therapy**, London, v. 5, n. 4, p. 727-743, Aug. 2007.

RODRIGUES, M. M.; RIBEIRÃO, M.; BOSCARDIN, S. B. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Immunology letters**, Netherlands, v. 73, n. 1, p. 43-50, Jul. 2000.

SALES-CAMPOS, H; SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; SILVA, J. S.; CARDOSO, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, Netherlands, v. 13, n. 2, p. 201-210, Feb. 2013.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. **Annual review of immunology**, United States, v. 18, p. 593-620, 2000.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clinica et biologica**, São Paulo, v. 20, p. 191-208. 1953.

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

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, n. 2, p. 115-119, Mar. 1999.

TAKETA, A. T.; GNOATTO, S. C.; GOSMANN, G.; PIRES, V. S.; SCHENKEL, E. P.; GUILLAUME, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 67, n. 10, p. 1697-1700, Oct. 2004.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and infection**, France, v. 2, n. 8, p. 851-66, Jul. 2000.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O.; BARCELOS, L. S.; GOMES, Y. M.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical infectious diseases**, Basel, v. 38, n. 7, p. 943-950, Apr. 2004.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate medical journal**, London, v. 82, n. 974, p. 788-798, Dec. 2006. Review.

TORRES-SANTOS, E. C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R. R.; CARAUTA, J. P.; FALCÃO, C. A.; KAPLAN, M. A.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 11, n. 2-3, p. 114-120, Feb. 2004.

XI, J.; CHANG, Q.; CHAN, C. K.; MENG, Z. Y.; WANG, G. N.; SUN, J. B.; WANG, Y. T.; TONG, H. H.; ZHENG, Y. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. **AAPS PharmSciTech**, United States, v. 10, n. 1, p. 172-182, Mar. 2009.

YIN, M. C.; CHAN, K. C. J. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 55, n. 17, p. 7177-7181, Aug. 2007.