UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Mariana Rosa da Silva

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ribeirão Preto

2009

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
Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito.
46 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Albuquerque, Sérgio de.

1. Toxoplasma gondii. 2. Ácido ursólico. 3. Ácido oleanóico. 4. Padronização. 5. Método colorimétrico. 6. Avaliação de substâncias.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Rosa da Silva

Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii,* com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

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:_____

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 ceder células da linhagem Vero utilizadas neste trabalho, e ao pós-graduando Luiz Miguel Pereira, pelas dicas de cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Zeki Naal e à Prof. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal, do Laboratório de Pesquisa de Química Geral e Inorgânica da FCFRP - USP, por permitirem o uso do equipamento leitor de fluorescência em seu laboratório de pesquisa.

À pós-graduanda Marcela Santos, à Laila e à Maria Perpétua, do Laboratório de Pesquisa de Química Geral e Inorgânica da FCFRP - USP, pela ajuda na utilização do leitor de fluorescência.

À Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, docente da Disciplina de Parasitologia da FCFRP - USP, pelo apoio e amizade.

À Miriam, Toninha e Georgius, pelo auxílio constante, companhia e amizade.

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

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

“É bem melhor lutar em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, de que formar fila com os pobres de espírito, pois nem gozam muito, nem sofrem muito, apenas vivem numa penumbra cinzenta sem saber o que é derrota ou vitória”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

SILVA, M.R. Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii,* com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito. 2009. 46f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, de distribuição mundial, e que infecta diversas espécies hospedeiros, como mamíferos e aves, possuindo como hospedeiros definitivos o gato e outros felídeos, enquanto o homem e outros animais são os seus hospedeiros intermediários. O tratamento é feito, na maioria das vezes, com uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina, agindo na via metabólica do ácido fólico, o qual é necessário para a biossíntese de purinas, pirimidinas e certos aminoácidos. Propusemos estabelecer um protocolo de avaliação sobre esse protozoário, assim como padronizarmos uma metodologia por espectroscopia para uma rápida avaliação ou triagem de substâncias potencialmente ativas contra o parasito. Verificamos a atividade das substâncias ácido ursólico e ácido oleanóico, as quais já demonstraram atividade biológica sobre outras espécies de protozoários, como *Plasmodium*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*. em sistemas *in vitro* e *in vivo*. A metodologia colorimétrica pelo MTT, pelo Alamar Blue®, do kit CyQUANT® NF e a contagem manual em meio líquido das formas taquizoítas do parasito em ensaios biológicos *in vitro* mostram-se inviáveis, pois há grande dificuldade em manter a integridade do parasita em meio de cultura líquido, o qual se mostra sensível à adição de qualquer outro componente que não aqueles necessários para manter sua viabilidade em ambiente extracelular. O ácido ursólico mostrou-se potencialmente ativo *in vitro* sobre formas intracelulares de *T. gondii.* Entretanto, o contato de células infectadas com as substâncias avaliadas por um período de 48 horas não resultou em diminuição mais acentuada na porcentagem de células infectadas do que a ocorrida no tratamento de 24 horas. A comparação dos resultados do tratamento pós infecção celular por 24 horas e do pré-tratamento das formas taquizoítas houve diferenças significativas, indicando principalmente maior ação do pré-tratamento sobre *T. gondii*. Quando administrado na dose de 7 mg/kg/ dia a camundongos infectados, o ácido ursólico não apresentou atividade sobre o parasita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Ácido ursólico; Ácido oleanóico; Padronização; Método colorimétrico; Avaliação de substâncias.

ABSTRACT

SILVA, M.R. Standartization of a colorimetric method for evaluation of substances biological activity on tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*, with evaluation of acid triterpenes on parasite. 2009. 46f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Toxoplasma gondii is an Apicomplexa protozoan, of worldwide distribution, that infects several species, from mammalians to birds; its definitive hosts are the cats and other felines, while man and other animals are considered as intermediate hosts. Treatment is, generally, a combination of sulfadiazine and pyrimethamine, triggering the metabolic pathway of folic acid, which is necessary for certain purines, pirimidines and aminoacids biosynthesis. We have proposed an evaluation protocol on this protozoan, and also to establish a methodology by spectroscopy for rapid evaluation of pottentialy bioactive substances against the parasite. The ursolic acid and oleanoic acid bioactivity were tested. These substances have already demonstrated to be effective on another protozoan species, like *Plasmodium*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*., either *in vitro* or *in vivo*. The colorimetric methodology by MTT, Alamar Blue®, CyQUANT® NF kit and manual counting of tachyzoite forms in liquid culture medium showed to be unviable, because there is a great difficult to maintain the parasite viability in liquid culture medium, wich one is sensible to addition of any other component different of that necessary for its survival in extracelular ambient. Ursolic acid was pottentialy active on *T. gondii* intracellular forms. However, the infected cells in contact with the tested substances for a period of 48 hours did not show a statistical greater reduction as compared to infected cells which underwent treatment for 24 hours. Significant results were observed when comparing pre-treatment of tachyzoite forms and treatment for 24 hours post-cellular infection. Our data pointed in the direction that pre-treatment exerted a higher effectiveness. Any parasiticidal activity was observed when ursolic acid on a concentration of 7 mg/kg/day was administered to infected mice.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Ursolic acid; Oleanoic acid; Standartization; Colorimetric method; Substances evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos ácidos ursólico e oleanóico 11

Figura 2. Porcentagem de lise celular em diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanóico 21

Figura 3. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres no ensaio *in vitro* com os ácidos ursólico e oleanóico, obtida na contagem manual..... 22

Figura 4. Correlação entre os valores de absorvância, número de taquizoítas por mL e diferentes concentrações de MTT após 4 horas de incubação 23

Figura 5. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres com o ácido ursólico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico utilizando DMSO em substituição ao isopropanol ácido 24

Figura 6. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres com o ácido oleanóico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico utilizando DMSO em substituição ao isopropanol ácido 25

Figura 7. Porcentagens de lise do ácido ursólico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico com Alamar Blue® 26

Figura 8. Porcentagens de lise do ácido oleanóico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico com Alamar Blue® 26

Figura 9. Curva de regressão linear da avaliação da determinação quantitativa de formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* empregadas no ensaio utilizando-se o Kit CyQUANT® NF (Invitrogen) 28

Figura 10. Avaliação do tempo de incubação ideal empregado no ensaio utilizando-se o kit CyQUANT® NF (Invitrogen) 29

Figura 11. Relação entre a porcentagem de células infectadas no controle negativo (sem substâncias) e em cada uma das concentrações do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina+pirimetamina, após tratamento por 24 horas 30

Figura 12. Curva de atividade do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina sobre formas intracelulares de *T. gondii*..... 31

Figura 13. Relação entre a porcentagem de células infectadas no controle negativo (sem substâncias) e em cada uma das concentrações do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina, após tratamento por 48 horas 32

Figura 14. Relação entre a porcentagem de células infectadas no controle negativo (sem substâncias) e em cada uma das concentrações do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina, após pré-tratamento de formas taquizoítas e posterior infecção de células Vero..... 33

Figura 15. Relação entre a porcentagem de células infectadas no tratamento pós infecção celular por 24 horas e do pré-tratamento das formas taquizoítas de *T. gondii*..... 35

Figura 16. Número de formas taquizoítas encontradas em cada grupo de animais da avaliação *in vivo* da atividade do ácido ursólico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina, comparados ao grupo controle (sem tratamento) .. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Tyrode 16

Tabela 2. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres no ensaio *in vitro*, determinada por contagem manual 22

Tabela 3. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Tratamento pós infecção de células Vero por 24 horas. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05 31

Tabela 4. Valores de IC_{50} das substâncias avaliadas *in vitro* 31

Tabela 5. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Tratamento pós infecção de células Vero por 48 horas. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05 33

Tabela 6. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Pré-tratamento de formas taquizoítas e posterior infecção de células Vero. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05 34

Tabela 7. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Relação entre o ensaio *in vitro* de tratamento pós infecção celular por 24 horas e o de pré-tratamento das formas taquizoítas. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05 34

Tabela 8. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Ensaio *in vivo*. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL-12	Interleucina 12
IFN-γ	Interferon gama
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
μg	Micrograma(s)
IC_{50}	Dose efetiva 50%
DNA	Desoxiribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
SAG	Antígeno de superfície
ROP	Antígeno de róptria
GRA	Antígeno de grânulos densos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
mL	Mililitro(s)
μM	Micromolar
μL	Microlitro(s)
nm	Nanômetros
mg	Miligrama(s)
kg	Quilograma(s)

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS v

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vi

1. INTRODUÇÃO 2

2. OBJETIVOS 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 11
3.1. Cepa do parasito 11
3.2. Amostras para avaliação biológica 11
3.3. Ensaios biológicos *in vitro* 11
3.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos ácidos ursólico e oleanóico sobre células Vero 11
3.3.2. Preparação dos parasitos 12
3.3.3. Avaliação do ácido ursólico e oleanóico sobre formas taquizoítas livres *in vitro* por contagem manual 13
3.3.4. Avaliação da concentração de MTT e do número de formas taquizoítas empregadas no ensaio colorimétrico 13
3.3.5. Ensaios sobre formas taquizoítas por avaliação colorimétrica 14
3.3.5.1. Ensaio colorimétrico do MTT 14
3.3.5.2. Ensaio colorimétrico do Alamar Blue® 15
3.4. Verificação da viabilidade dos taquizoítas livres pelo Azul de Tripan 16
3.5. Avaliação da quantidade de formas taquizoítas e do tempo de incubação empregados no ensaio do kit CyQUANT NF® (Invitrogen) 16
3.6. Ensaio *in vitro* sobre as formas intracelulares de *Toxoplasma gondii* 17
3.6.1. Tratamento pós infecção de células Vero por 24 e 48 horas 17
3.6.2. Pré-tratamento de formas taquizoítas por 1 hora e posterior infecção de células Vero 18
3.7. Ensaio *in vivo* 19
3.8. Cálculos 19

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 21
4.1. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos ácidos ursólico e oleanóico sobre células Vero 21
4.2. Avaliação do ácido ursólico e oleanóico sobre formas taquizoítas livres *in vitro* por contagem manual 22
4.3. Avaliação da concentração de MTT e do número de formas taquizoítas empregadas no ensaio colorimétrico 23
4.4. Ensaio sobre formas taquizoítas livres por avaliação colorimétrica 23
4.4.1. Ensaio colorimétrico do MTT 23

4.4.2. Ensaio colorimétrico do Alamar Blue® 25
4.5. Avaliação da quantidade de formas taquizoítas e do tempo de incubação empregados no ensaio do kit CyQUANT® NF (Invitrogen) 28
4.6. Ensaio *in vitro* sobre formas intracelulares de *Toxoplasma gondii* 30
4.6.1. Tratamento pós infecção de células Vero 30
4.6.1.1.Tratamento por 24 horas 30
4.6.1.2.Tratamento por 48 horas 32
4.6.2. Pré-tratamento de formas taquizoítas por 1 hora e posterior infecção de células Vero 33
4.7. Ensaio *in vivo* 36

5. CONCLUSÕES 40

6. REFERÊNCIAS 42

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, de distribuição mundial, e que infecta diversas espécies de hospedeiros, como mamíferos e aves, possuindo como hospedeiros definitivos o gato e outros felídeos, enquanto o homem e outros animais são os seus hospedeiros intermediários (KAWAZOE, 2003).

O ciclo biológico de *T. gondii* possui duas fases: assexuada, onde o hospedeiro intermediário pode se infectar ao ingerir oocistos nos alimentos ou nas mãos, cistos com bradizoítos em carne crua ou mal cozida ou taquizoítos livres encontrados nos líquidos somáticos. Após invasão inicial das células intestinais, o parasita multiplica-se e invade diversos tipos de células, principalmente macrófagos, disseminando assim para vários órgãos. Se o hospedeiro desenvolve imunidade, *T. gondii* sofre encistamento nos tecidos, com bradizoítos que se multiplicam lentamente; e sexuada, em que o hospedeiro definitivo se infecta por ingestão de cistos presentes na carne de outro animal, oocistos maduros do solo ou macrófagos com taquizoítos. A mulher gestante poderá transmitir taquizoítos ou bradizoítos ao feto através da circulação placentária.

A gestante que sofre infecção primária durante a gravidez pode transmitir *T. gondii* ao feto, causando lesões inflamatórias que podem resultar em danos neurológicos permanentes, apresentando ou não hidrocelafia, e coriorretinite, com grave perda da visão. Tanto a mãe quanto o feto são assintomáticos, porém, é possível que a criança manifeste coriorretinite recorrente ao longo da vida (PETERSEN, 2007).

Um conjunto de organelas apicais do parasita, chamadas róptrias, desempenham importante papel na invasão das células do hospedeiro e também agem no controle dos processos celulares da célula parasitada. Há evidências de que estas organelas secretam seu conteúdo através de reconhecimento direto entre a superfície apical de *T. gondii* e uma ou mais moléculas receptoras da célula hospedeira, por mecanismos ainda não esclarecidos (BOOTHROYD & DUBREMETZ, 2008).

Pacheco-Soares *et al*. (1998) relatam que, durante a interação de *T. gondii* com a célula hospedeira, alguns componentes da membrana desta são

internalizados, tornando-se parte da membrana do vacúolo parasitóforo em formação. Ocorre também troca de componentes de superfície entre ambas, como lipídios, proteínas e sialoglicoconjugados; porém, no processo de internalização do parasita e formação da membrana do vacúolo parasitóforo, eles são excluídos, pois não se observam presença destes componentes na membrana plasmática do parasita, nem na membrana do vacúolo parasitóforo formado.

No hospedeiro definitivo o parasita penetra as células epiteliais intestinais, onde passa para a forma trofozoíta e se multiplica (formação dos merozoítos). Ao ser liberado na luz intestinal infecta novas células, continuando a multiplicação assexuada ou sexuada. Nesta, merozoítos se transformam em macrogametas (femininos) e microgametas flagelados (masculinos). A fusão destes origina cistos imaturos, que após amadurecimento são liberados nas fezes e para o meio exterior. No solo ocorre a esporogonia, que torna os oocistos infectantes (KAWAZOE, 2003).

A manifestação da doença em humanos é variável, desde casos assintomáticos, na maioria dos indivíduos imunocompetentes, até severos em fetos humanos e de vários mamíferos, e em indivíduos imunodeprimidos, como os portadores de AIDS (BOOTHROYD & GRIGG, 2002).

Os sintomas oculares variam de acordo com a idade do paciente, sendo que o tratamento é feito com medicação específica e corticosteróides. Algumas das medicações usadas são pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, trimetroprim-sulfametaxazol, espiramicina, azitromicina, atovaquona, tetraciclina e minociclina (BONFIOLI & OREFICE, 2005). A manifestação visceral aguda da doença é rara, mas já foi observada em pacientes adultos saudáveis na Guiana Francesa (CARME *et al*., 2002).

A toxoplasmose é uma infecção oportunista em indivíduos imunodeprimidos, porém em indivíduos sadios a infecção geralmente é assintomática ou pouco se manifesta devido à resposta imune contra os taquizoítos, os quais são eliminados ou se transformam em bradizoítos que permanecem encistados no músculo esquelético, cardíaco e no sistema nervoso central (ALEXANDER *et al*., 1997).

Análises genéticas vieram a confirmar a existência de um pequeno número de cepas de *T. gondii* que se enquadram em três genótipos distintos, conhecidos como tipo I, II e III. Há, ainda, um número crescente de cepas pertencentes a outras duas classificações: as cepas recombinantes, as quais possuem genótipos relacionados aos três tipos anteriores, e as cepas exóticas, de hospedeiros pouco comuns do

parasita. As evidências de que o desenvolvimento e a gravidade da doença depende, entre outros fatores, da cepa que infectou o hospedeiro são cada vez maiores. Alguns estudos relatam que as cepas do tipo II estão presentes na maioria dos casos de infecção congênita e pacientes imunocomprometidos.

Em pacientes imunocompetentes com toxoplasmose aguda e grave comprometimento ocular, que não responderam a tratamento apropriado, foram identificadas cepas do tipo I, que se mostraram bastante virulentas também em camundongos (BOOTHROYD & GRIGG, 2002).

Quando se inicia a infecção por *T. gondii* os macrófagos albergam os taquizoítas, os quais têm sua multiplicação inibida ao ocorrer a fusão entre fagossomos e lisossomos (KAWAZOE, 2003). Estudos demonstram que o controle da infecção aguda por *T. gondii* é dependente da ação da interleucina 12 (IL-12) e interferon γ (IFN- γ), sendo que o óxido nítrico (NO) também desempenha um papel importante no controle da infecção persistente. Porém, é importante que exista um equilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias que controlam a infecção e citocinas regulatórias da inflamação, a fim evitar danos maiores ao hospedeiro. A deficiência de qualquer destas citocinas resulta em menor sobrevida do hospedeiro infectado (ALEXANDER *et al*., 1997).

O tratamento é feito, na maioria das vezes, com uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina, agindo na via metabólica do ácido fólico, o qual é necessário para a biossíntese de purinas, pirimidinas e certos aminoácidos. Os metabólitos da sulfadiazina que possuem um grupo para-amino-fenil interferem na síntese do ácido fólico de *T. gondii*. A presença do grupo -OH nos metabólitos hidroxilados lhes conferem um caráter hidrofílico que permite menor passagem através da membrana lipofílica do parasita e maior excreção pelo organismo. Um dos metabólitos não possui o grupo para-amino-fenil, portanto, não tem ação contra o parasita.

A pirimetamina, neste estudo realizado por van de Ven *et al*. (1995) fez com que a IC_{50} da sulfadiazina fosse semelhante à sua concentração plasmática *in vivo* efetiva sobre *T. gondii*, evitando, assim, possíveis efeitos tóxicos devido a altas concentrações de sulfadiazina.

Ainda não existe um medicamento eficaz no tratamento da toxoplasmose. As drogas utilizadas atuam sobre as formas proliferativas, mas não nos cistos. Como a maioria das pessoas com sorologia positiva não apresenta a doença, e pelo fato de

as drogas empregadas serem tóxicas em usos prolongados, recomenda-se o tratamento apenas dos casos agudos, da toxoplasmose ocular e dos indivíduos imunodeficientes com toxoplasmose de qualquer tipo ou fase (KAWAZOE, 2003).

A partir da observação de que pacientes infectados pelo vírus HIV, submetidos a terapia antiretroviral eram menos suscetíveis a infecções oportunistas causadas por protozoários, e de estudos os quais relatavam que as drogas inibidoras da enzima HIV-protease provavelmente também agiriam sobre as proteases presentes em protozoários, Pozio (2004) considera, apesar da toxicidade de tais fármacos para os humanos, principalmente em tratamentos prolongados, que esta deve ser uma alternativa melhor analisada e estudada, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos efetivos nestas infecções oportunistas.

No estudo de Derouin & Santillana-Hayat (2000), drogas antiretrovirais, sendo cinco análogos de nucleosídeos e quatro inibidores da enzima protease (evidências sugerem que esta seja a enzima aspartil protease, a qual parece ter grande importância na replicação do parasita), foram testadas *in vitro* em associação com pirimetamina e sulfadiazina. Os resultados se mostraram favoráveis, com coeficientes de inibição de 50% dos parasitas (IC_{50}) sem toxicidade significativa para as células utilizadas nos ensaios. Os autores sugerem, com bases nos dados obtidos, que a enzima protease está presente em *T. gondii* e participa do seu processo de replicação.

A avaliação feita por Lescano *et al*. (2004) demonstra bons resultados da associação de azitromicina e pirimetamina no tratamento de camundongos infectados por *T. gondii*.

Outras associações de drogas já foram testadas, porém, nem todas foram efetivas no combate a *T. gondii*, como relatado por Romand *et al*. (1993). O autor observou que a atovaquona não apresenta maior atividade sobre o parasita quando administrada juntamente com sulfadiazina, minociclina, claritomicina ou pirimetamina a camundongos experimentalmente infectados. Esta última mostrou, na verdade, um efeito antagonista significante sobre a ação da atovaquona.

Uma alternativa que tem sido bastante explorada por diversas pesquisas (XUE *et al*., 2008; CUI *et al*., 2008; ZHANG *et al*., 2007; ZHOU *et al*., 2007; LIU *et al*., 2006; MÉVÉLEC *et al*., 2005) é o desenvolvimento de vacinas que utilizam antígenos recombinantes do parasita, como a SAG1 e SAG2 (antígenos de superfície), ROP2 (antígeno de róptria), GRA2 (antígeno de grânulos densos), ou

vacinas de DNA, que contém as seqüências codificantes de tais antígenos. Em associação administram-se adjuvantes, tal como a IL-12 e o IFN-γ, importantes na resposta imune contra *T. gondii*. Os resultados são favoráveis, principalmente quando mais de um antígeno ou DNA codificante são inoculados, juntamente com um adjuvante, na mesma vacina, prolongando a sobrevida e os níveis de anticorpos produzidos pelos animais durante o experimento.

A atividade biológica de substâncias naturais originárias de espécies vegetais e seus derivados sobre agentes parasitários também tem sido alvo de diversas pesquisas. Mas muito pouco tem se pesquisado em relação às substâncias de origem natural sobre o agente da toxoplasmose.

A falta de histórico etnofarmacológico sobre a utilização popular de plantas contra esse agente etiológico causa pouco interesse nos grupos de pesquisa na procura de potenciais vegetais que possuam esse tipo de atividade.

Exemplo claro disso é que dos poucos trabalhos publicados referentes ao tema, a maioria está relacionada com a aplicação de produtos vegetais com atividade já confirmada sobre espécies pertencentes ao gênero *Plasmodium*, protozoários também pertencentes ao Filo Apicomplexa, tal qual *T. gondii.*

Nesse sentido, apenas dois trabalhos se destacam em termos de avaliação anti-toxoplasma, em sistema *in vitro.*

Benoit-Vical *et al*. (2000) demonstraram o efeito *in vitro* de extratos em solventes orgânicos de *Vernonia colorata* sobre *T. gondii*, sendo essa espécie vegetal originária da região oeste da África e utilizada pela medicina popular contra a infecção por *Plasmodium falciparum*. Para os extratos em diclorometano, acetona e etanol os IC_{50}, foram, respectivamente, de 1,7; 2,6 e 2,9 mg/mL.

Mais recentemente, Vilela & Melo (2006) verificaram a atividade biológica de extratos das folhas de *Azadirachta indica* e *Melia azedarach*, observando que somente em elevadas concentrações é possível a observação de atividade significativa sobre o parasita (5.000 μg/mL), mesmo assim sem determinar atividade citotóxica.

Em virtude da inexistência de estudos referentes à atividade biológica de novas substâncias sobre *T. gondii,* e aproveitando a experiência existente em nosso grupo de pesquisa em avaliação desse tipo sobre outros agentes parasitários humanos, é nossa meta estabelecermos um protocolo de avaliação sobre esse protozoário, assim como padronizarmos uma metodologia por espectroscopia que

possibilite uma rápida avaliação ou triagem de substâncias potencialmente ativas contra o parasito.

Para tanto estamos propondo definirmos uma estratégia de cultivo, caracterização do efeito biológico *in vitro* sobre o parasito, além de estarmos também definindo estratégias de avaliação da atividade de substâncias em sistemas *in vivo*, observando o desenvolvimento do parasita em modelo experimental altamente suscetível à infecção.

Como amostras de avaliação do presente trabalho, estaremos trabalhando com os triterpenos ácidos ursólico e oleanóico.

São várias as ações benéficas já relatadas destas substâncias, tais como ação hepatoprotetora, antitumoral, benefícios para o sistema cardiovascular (LIU, 2005; LIU, 1995), ação antiinflamatória, anti-hiperlipidêmica (LIU, 1995), e atividade anti-oxidante (YIN & CHAN, 2007), entre outras existentes na literatura.

Essas amostras já demonstraram, recentemente, atividade antiparasitária em diferentes espécies de protozoários, como contra *Plasmodium falciparum* (STEELE *et al*., 1999), *Trypanosoma* sp. (CUNHA *et al*., 2003; TAKETA *et al*., 2004) e espécies de *Leishmania* (TORRES-SANTOS *et al*., 2004), o que pode ser considerado como fator precedente à suas escolhas como objeto de estudo de padronização metodológica, mesmo tendo a utilização em paralelo de substâncias utilizadas na terapêutica de casos agudos de toxoplasmose.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

São objetivos deste trabalho:

1. Padronizar a metodologia colorimétrica pelo MTT (3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo) sobre as formas taquizoítas do parasito em ensaios biológicos *in vitro*;
2. Avaliar as atividades biológicas *in vitro,* sobre as formas intracelulares do parasito, de diferentes extratos de espécies do gênero *Miconia* e dos triterpenos ácidos ursólico e oleanóico;
3. Avaliar em sistema *in vivo* as atividades dos ácidos ursólico e oleanóico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepa do parasito

No presente estudo é utilizada uma cepa isolada de caso humano de toxoplasmose aguda (RH) e que vem sendo mantida em nosso laboratório por meio de repiques semanais em camundongos *Swiss.*

3.2. Amostras para avaliação biológica

Estão sendo utilizadas as seguintes substâncias: ácido oleanóico (a), e ácido ursólico (b), cujas estruturas seguem abaixo:

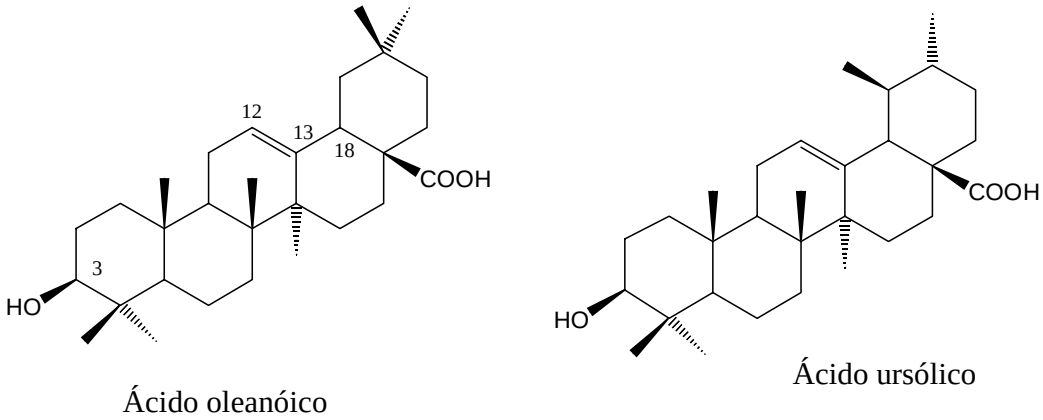

Figura 1. Estruturas químicas dos ácidos ursólico e oleanóico.

3.3. Ensaios biológicos *in vitro*

3.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos ácidos ursólico e oleanóico sobre células Vero

Células da linhagem Vero, obtidas de cultivo em RPMI 1640 incolor suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado foram centrifugadas e ressuspendidas no mesmo meio de cultura, a seguir fez-se a contagem em câmara de Neubauer para ajustar o valor da suspensão para 5 x 10^5 células/mL. Em

microplaca de 96 poços (100 µL/poço), as células foram incubadas com as substâncias nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM por 24 horas em estufa de 5% de CO_2 a 37°C. Após este período adicionou-se 10 µL por poço de MTT dissolvido (5 mg/mL) em PBS, sendo então incubado por 4 horas. A seguir 90 µL de isopropanol ácido foi adicionado por poço, e a placa mantida a temperatura ambiente por 1 hora, até que os cristais formados fossem dissolvidos e a leitura realizada em espectrofotômetro (Sunrise Tecan) a 570 nm, com valores processados pelo programa Magellan 3. Como controle positivo utilizamos Triton X-100 a 20%, e como controle negativo solução fisiológica com 1,0% de dimetilsulfóxido (DMSO). O cálculo foi feito da seguinte maneira:

Y= 100-([Y/(CN-CP)] x 100), onde:

Y= absorvância do poço tratado;
CN = absorvância dos poços controle negativo (com DMSO);
CP = absorvância dos poços controle positivo (com Triton X-100).

Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.2. Preparação dos parasitos

Inicialmente, células da linhagem Vero foram infectadas na proporção de 10:1, ou seja 10 formas taquizoítas de *T. gondii* para 1 célula Vero. As formas taquizoítas foram obtidas da lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados. Após um período de 72 horas, era esperado obter grandes quantidades de formas taquizoítas do sobrenadante dessas culturas, em conseqüência da lise das células repletas de parasitas. Porém, a quantidade de formas taquizoítas presentes no meio de cultura foi insuficiente para ser utilizado no ensaio *in vitro*. Assim, optou-se por utilizar o parasita obtido diretamente do lavado peritoneal, após centrifugação (1000 rpm, 5 min, a 27°C) e separação do sobrenadante do sedimento, sendo que as formas taquizoítas estavam presentes em abundância no sobrenadante, o qual foi submetido à contagem em hemocitômetro de Neubauer,

para ajustar as quantidades de parasitas utilizadas nos procedimentos experimentais.

3.3.3. Avaliação do ácido ursólico e oleanóico sobre formas taquizoítas livres *in vitro* por contagem manual

Os ensaios seriam realizados utilizando-se as formas taquizoítas (entre 1 e $5x10^6$/mL), obtidas do lavado peritoneal de camundongos infectados. Para os ensaios foram utilizadas as concentrações finais das substâncias de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM, diluídas em solução de 1% de Dimetil-sulfóxido (DMSO) em solução fisiológica. Os parasitos foram avaliados após um período de 24 horas de incubação do material, em estufa à temperatura de 37°C, por contagem pelo método de Brener (1962). Foram contados os parasitas em 50 campos microscópicos, no aumento de 40 vezes, e o número obtido foi multiplicado pelo fator 20.214, determinado para o microscópio; temos assim o número de parasitas por mL. A quantificação da porcentagem de lise foi feita de acordo com a fórmula abaixo descrita:

% lise = [(EB-E)/(EB)] x 100 , onde:

EB = nº. de parasitos encontrados nos poços de controle negativo (meio de cultura contendo parasitas e DMSO);
E = nº. de parasitos encontrados nos poços tratados.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.4. Avaliação da concentração de MTT e do número de formas taquizoítas empregadas no ensaio colorimétrico

Foram testadas, antes do ensaio com as substâncias a serem avaliadas, as concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL de MTT, dissolvido em PBS. As formas taquizoítas utilizadas nesta avaliação foram obtidas do lavado peritoneal com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, o qual foi centrifugado (1000 rpm, 5 minutos, 27°C) e, em seguida, o sobrenadante contendo

parasitas foi separado do sedimento. Além da variação da concentração de MTT, também foi variada a quantidade de formas taquizoítas em suspensão: $5x10^4$; $5x10^5$ e $5x10^6$ taquizoítas/mL, sendo que estas suspensões tiveram suas quantidades de formas ajustadas por contagem em câmara de Neubauer. As suspensões foram distribuídas em placas de 96 poços (100 μL/poço). Adicionou-se 10 μL de MTT e após 4 horas de incubação a 37°C foram adicionados 90 μL de isopropanol ácido para que os cristais resultantes da reação fossem dissolvidos. Após 1 hora fez-se a leitura em 570 nm em leitor Sunrise Tecan, com valores processados pelo programa Magellan 3. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.5. Ensaios sobre formas taquizoítas por avaliação colorimétrica

3.3.5.1. Ensaio colorimétrico do MTT

Inicialmente, a proposta para validação do ensaio colorimétrico foi baseada na metodologia descrita por Muelas-Serrano *et al*. (2000). As formas taquizoítas de *T. gondii* (entre 1 e $5x10^6$/mL), obtidas do lavado peritoneal de camundongos infectados, com RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, , foram incubadas em placas de 96 poços (100 μL/poço), a 37º C, por um período de 24 horas, utilizando-se como base de diluição das amostras a serem avaliadas as mesmas concentrações descritas para o ensaio do item 3.3.3.

Após o período de incubação, foi realizada a verificação da atividade biológica utilizando a técnica colorimétrica pelo – 3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT- ACRÓS Organics), a qual se baseia na interação do sal tetrazolium com mitocôndrias ativas, produzindo o composto formazan. De acordo com a técnica foram adicionados 10 μL de solução de MTT na concentração de 5 mg/mL, dissolvido em PBS, com incubação a 37°C, por 4 horas. Após esse período, foi adicionado 90 μL de isopropanol ácido (100 μL de HCl 0,04N em isopropanol) e 1 hora depois realizada a leitura da microplaca em leitor Sunrise Tecan, em filtro de 570 nm, com valores processados pelo programa Magellan 3.

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

%AE = {1- [(AE-CP)/(CN-CP)]} x 100 , onde:

AE = absorvância dos poços tratados;
CP = absorvância dos poços contendo controle positivo (apenas meio de cultura);
CN = absorvância dos poços contendo controle negativo (meio de cultura contendo parasitas e DMSO);

Este mesmo ensaio foi repetido, modificando apenas a composição do meio RPMI utilizado no início, cuja composição era: suplementação com 10% de soro bovino fetal inativado, penicilina (5,0 mL/L) e HEPES (2,8 g/L) . As modificações, em cada ensaio, feitas neste meio, foram: retirada da penicilina e retirada do HEPES.

Outras duas modificações do meio RPMI, baseadas no estudo de Räisänen (1978), também foram testadas neste ensaio: suplementação do meio contendo penicilina e HEPES com 30% e 50% de soro bovino fetal inativado.

3.3.5.2. Ensaio colorimétrico do Alamar Blue®

A metodologia aqui empregada utilizou a resazurina (Alamar Blue®), também utilizada por Bénéré *et al*. (2007), Rolón *et al*. (2006), Pettit *et al*. (2005) e O'Brien *et al*. (2000). A resazurina, de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resofurin, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida; porém o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido, o qual pode ocorrer por reações enzimáticas ou químicas em células viáveis. O Alamar Blue® é empregado em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular, determinação da função mitocondrial (ROLÓN *et al*. 2006; O'BRIEN *et al*. 2000). Inicialmente, as formas taquizoítas de *T. gondii* (entre 1 e $5x10^6$/mL), obtidas do lavado peritoneal foram incubadas em placas de 96 poços (200 μL/poço), a 37º C, por um período de 24 horas, com o ácido ursólico e o ácido oleanóico, nas concentrações 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM. A seguir, foram adicionados 20 μL de Alamar Blue®, dissolvido em PBS, na concentração de 1,5 mM. Após 5 horas de incubação a 37°C, fez-se a leitura em leitor Sunrise Tecan, em filtro de 570 nm, com valores processados pelo programa Magellan 3. Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se inicialmente o mesmo procedimento de padronização determinado para o MTT.

3.4. Verificação da viabilidade dos taquizoítas livres pelo Azul de Tripan

Em todos os meios RPMI modificados utilizados nos ensaios do MTT verificou-se a viabilidade dos taquizoítas livres misturando-se partes iguais da suspensão de parasitas e de Azul de Tripan a 0,4%. Fez-se então a contagem nos quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer, diferenciando-se as formas viáveis, que permaneciam translúcidas, das formas mortas, que se coravam de azul. Para o cálculo da viabilidade utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{número de células vivas nos 4 quadrantes}}{\text{total de células contadas nos 4 quadrantes}} \times 100$$

3.5. Avaliação da quantidade de formas taquizoítas e do tempo de incubação empregados no ensaio do kit CyQUANT NF® (Invitrogen)

Este ensaio é baseado na medida do conteúdo do DNA celular, por meio da ligação de um reagente fluorescente, não revelado pelo fabricante, ao DNA. A quantidade de DNA presente na célula é altamente regulada, sendo proporcional e muito próxima ao número de células que estejam presentes no ensaio. Não há dependência de atividades fisiológicas celulares, as quais podem variar independentemente do número de células. A entrada do reagente fluorescente na célula ocorre devido à ação de um reagente de permeabilização da membrana plasmática durante a realização do ensaio.

Com a finalidade de evitar a interferência de proteínas presentes do meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 50% de soro bovino fetal inativado na leitura da fluorescência, como relatado pelo fabricante, mantiveram-se as formas taquizoítas viáveis na solução de Tyrode, com a seguinte composição:

Tabela 1. Composição da solução de Tyrode

Componente	Concentração (g/L)
NaCl	8,0
KCl	0,2
$MgCl_2.6H_2O$	0,26
$CaCl_2.2H_20$	0,20
$NaH_2PO_4.H_20$	0,065
$NaHCO_3$	1,0
Glicose	1,0

Antes do ensaio com as substâncias, realizamos avaliação semelhante à aquela feita para o MTT no item 3.3.4., a fim de verificar qual a quantidade de formas taquizoítas mais adequada a ser utilizada nos ensaios. Os reagentes do kit foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, portanto, modificamos apenas o número de formas taquizoítas presentes, sendo que o reagente fluorescente permaneceu na mesma concentração determinada pelo fabricante. A variação de formas taquizoítas foi de 250 a $2,5x10^4$ formas/poço, sendo que estas suspensões tiveram suas quantidades de formas ajustadas por contagem em câmara de Neubauer.

As suspensões foram distribuídas em placas de 96 poços (100 μL/poço). Para ocorrer a sedimentação dos parasitas nos poços da placa, esta foi centrifugada a 300 g por 7 minutos, e o sobrenadante retirado e substituído por 50 μL do reagente de permeabilização da membrana plasmática (tampão HBSS, Hank's Buffered Salt Solution). A seguir adicionou-se 50 mL da solução do reagente fluorescente. Após 30 minutos de incubação a 37ºC fez-se a leitura em leitor de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 530 nm, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliou-se também qual o tempo de incubação adequado após a adição do reagente fluorescente, seguindo o mesmo procedimento acima descrito, variando apenas o tempo de incubação de 30 a 60 minutos.

3.6. Ensaio *in vitro* sobre as formas intracelulares de *Toxoplasma gondii*

3.6.1. Tratamento pós infecção de células Vero por 24 e 48 horas

Os ensaios foram realizados seguindo metodologia semelhante à de Bastos *et al.* (2008). Em microplacas de 24 poços contendo lamínulas arredondadas, células da linhagem Vero ($1x10^5$ células/poço), foram cultivadas com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, por 24 horas, a 37^oC em ambiente a 5% de CO_2 e umidade de 95%. Formas taquizoítas obtidas do lavado peritoneal de camundongos *Swiss* previamente infectados foram adicionadas na proporção de 10:1 (parasitas : células) e incubadas por 24 horas. Após este período, os poços foram lavados com RPMI 1640 para a retirada dos taquizoítos restantes e

as substâncias em análise foram adicionadas nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM, exceto o ácido ursólico, que demonstrou alta citotoxicidade em 128,0 μM, sendo então testado até a concentração de 32,0 μM. Após o período de 24 e 48 horas de contato das células infectadas com as substâncias, o sobrenadante foi retirado e as células contidas nas lamínulas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas em Giemsa tamponado, pH 7,2, por 25 minutos. O número de células infectadas em um total de 100 células foi quantificada por observação ao microscópio. A atividade anti-toxoplasma intracelular foi determinada pela porcentagem de células infectadas em cada uma das concentrações testadas, verificando se houve diminuição no número de células infectadas. Foram aplicados aos resultados os testes estatísticos One Way ANOVA e o de comparação múltipla de Bonferroni.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.2. Pré-tratamento de formas taquizoítas por 1 hora e posterior infecção de células Vero

Os ensaios foram realizados seguindo metodologia semelhante à de Bastos *et al.* (2008). Em microplacas de 24 poços contendo lamínulas arredondadas, células da linhagem Vero ($1x10^5$ células/poço), foram cultivadas com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, por 24 horas, a 37°C em ambiente a 5% de CO_2 e umidade de 95%. Formas taquizoítas obtidas do lavado peritoneal de camundongos *Swiss* previamente infectados foram incubadas por 1 hora a 37ºC com as substâncias avaliadas nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM, exceto o ácido ursólico, o qual foi testado até a concentração de 32,0 μM, e em seguida adicionadas aos poços contendo células, e novamente incubadas por 24 horas a 37ºC. Após este período, o meio de cultura foi retirado dos poços e as células contidas nas lamínulas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas em Giemsa tamponado, pH 7,2, por 25 minutos. O número de células infectadas em um total de 100 células foram quantificadas por observação ao microscópio. A atividade anti-toxoplasma foi determinada pela porcentagem de células infectadas em cada uma das concentrações testadas, verificando se houve

diminuição no número de células infectadas. Foram aplicados aos resultados os testes estatísticos One Way ANOVA e o de comparação múltipla de Bonferroni.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7. Ensaio *in vivo*

Camundongos Balb/C machos, pesando aproximadamente 20 gramas, foram infectados via intraperitoneal com 10^3 formas taquizoítas de *T. gondii*. Três horas após o inóculo infectante, foram administradas as substâncias avaliadas, conforme a seguinte divisão:

Grupo I: 6 animais infectados sem qualquer tratamento;

Grupo II: 6 animais infectados tratados via oral com a dose de 7 mg/kg/dia de ácido ursólico;

Grupo III: 6 animais infectados tratados via oral com sulfadiazina e pirimetamina, ambas na dose de 7mg/kg/dia.

O tratamento durou 4 dias, sendo que no quinto dia os animais foram sacrificados, e obtidos o lavado peritoneal de cada um para quantificação do número de formas taquizoítas.

Foram aplicados aos resultados os testes estatísticos One Way ANOVA e o de comparação múltipla de Bonferroni.

3.8. Cálculos

Para os diversos cálculos matemáticos dos resultados utilizamos o software *GraphPad Prism 4.0*. A determinação do IC_{50} foi realizada através do método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos ácidos ursólico e oleanóico sobre células Vero

É interessante que as substâncias que tenham sua atividade biológica avaliada tanto sobre formas livres quanto formas intracelulares do parasita não sejam tóxicas, pois desta maneira não causarão morte ou danos às células hospedeiras. Podemos observar, através da Figura 2, que apenas em concentração elevada, de 128,0 µM do ácido ursólico, observou-se alta porcentagem de lise celular (média de 70,54%). Para o ácido oleanóico não foi observada qualquer citotoxicidade significativa sobre a célula hospedeira.

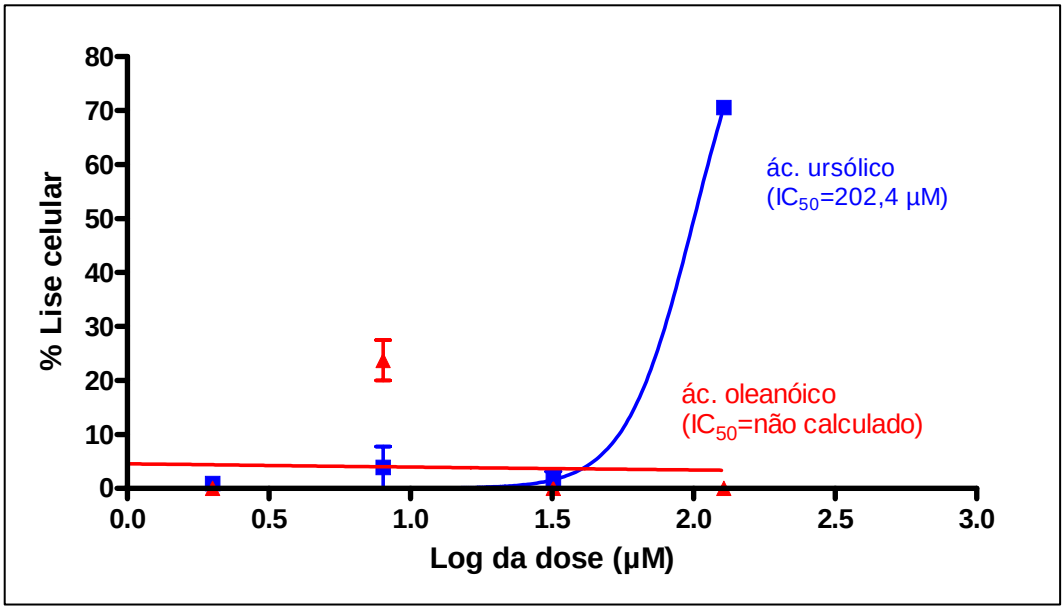

Figura 2. Porcentagem de lise celular em diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanóico.

Dessa forma, estas substâncias podem ter suas atividades avaliadas seguramente sobre formas intracelulares de *Toxoplasma gondii*, sem determinar danos à célula hospedeira, considerando-se as concentrações propostas para o ensaio.

4.2. Avaliação do ácido ursólico e oleanóico sobre formas taquizoítas livres *in vitro* por contagem manual

A contagem manual, primeiro método utilizado para avaliar a ação de substâncias sobre diversos parasitas, permitiu observar, através da porcentagem de lise, que o ácido ursólico é potencialmente ativo sobre *T. gondii*, sendo o valor de seu IC_{50} igual a 8,52 µM. O ácido oleanóico não mostra a mesma atividade, pois a lise é significativa apenas em 128,0 µM. Os valores de porcentagem de lise para cada um dos ácidos estão apresentados na Tabela 2 e Figura 3.

Tabela 2. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres no ensaio *in vitro*, determinada por contagem manual.

Substância	% Lise ± SD X Concentração (µM)					IC_{50} (µM)
	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0	
Ácido ursólico	27,20 ± 9,95	17,84 ± 3,29	36,61 ± 3,36	90,61 ± 0,00	85,94 ± 0,00	8,52
Ácido oleanóico	7,97 ± 5,67	41,98 ± 8,54	19,95 ± 11,27	17,92 ± 14,14	80,00 ± 0,00	54,26

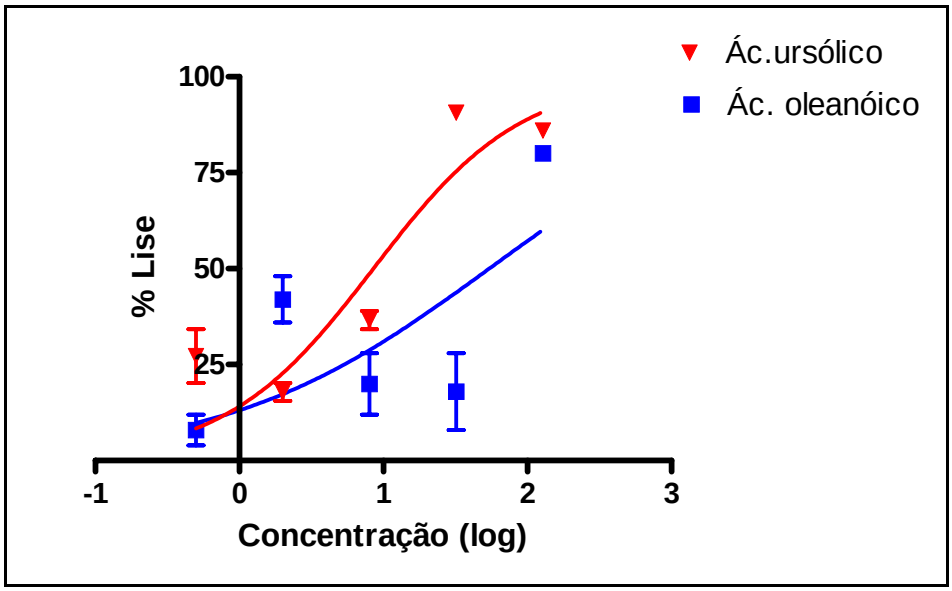

Figura 3. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres no ensaio *in vitro* com os ácidos ursólico e oleanóico, obtida na contagem manual.

4.3. Avaliação da concentração de MTT e do número de formas taquizoítas empregadas no ensaio colorimétrico

Antes da realização do ensaio com os ácidos ursólico e oleanóico, foram testadas diferentes concentrações do MTT e do parasita, a fim de verificar qual seriam os valores nos quais se obteriam a maior absorvância. A Figura 4 mostra a relação entre as variáveis.

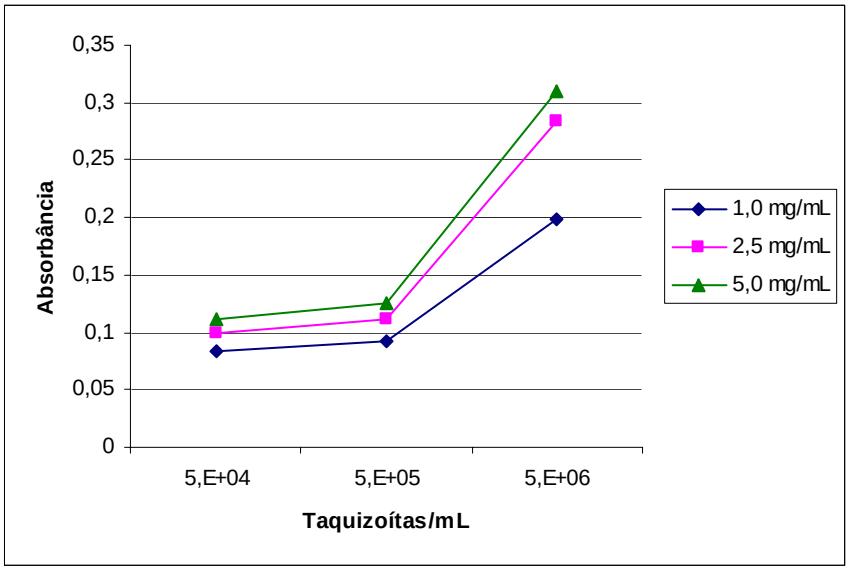

Figura 4. Correlação entre os valores de absorvância, número de taquizoítas por mL e diferentes concentrações de MTT após 4 horas de incubação.

Observamos que a absorvância foi maior ao utilizar o MTT na concentração de 5,0 mg/mL e a suspensão de taquizoítas em 5 x 10^6 formas/mL, os quais foram empregados no ensaio.

4.4. Ensaio sobre formas taquizoítas livres por avaliação colorimétrica

4.4.1. Ensaio colorimétrico do MTT

O ensaio colorimétrico foi realizado baseado na metodologia de Muelas-Serrano *et al*. (2000). Porém, ao adicionar o isopropanol ácido após as 4 horas de incubação dos parasitas com o MTT, foi observado o aparecimento de um

precipitado, o qual causou forte turvação na maioria dos poços. Provavelmente este precipitado é constituído de proteínas do parasita, pois nos poços onde havia apenas meio de cultura não ocorreu tal fato. Portanto, a leitura em 570 nm ao final do ensaio tornou-se inviável.

Dias *et al*. (1999), empregando o MTT para avaliação da viabilidade de *Tetrahymena pyriformis*, propõe em sua metodologia a adição de DMSO com a mesma finalidade do isopropanol, porém, sem que ocorresse qualquer precipitação. Desta maneira, em alternativa ao isopropanol, testamos o uso de DMSO como descrito pelo referido autor (proporção 1:1, ou seja, adicionou-se volume de DMSO igual ao existente no poço, considerando o inóculo com a droga e o volume de MTT), a fim de verificar a possibilidade de não formação de precipitado durante o ensaio com *T. gondii*.

Porém, ao comparar a porcentagem de lise obtida neste ensaio e da contagem manual (Figuras 5 e 6), notamos que ambas não correspondem, o que seria necessário para permitir a substituição da contagem manual pelo ensaio colorimétrico.

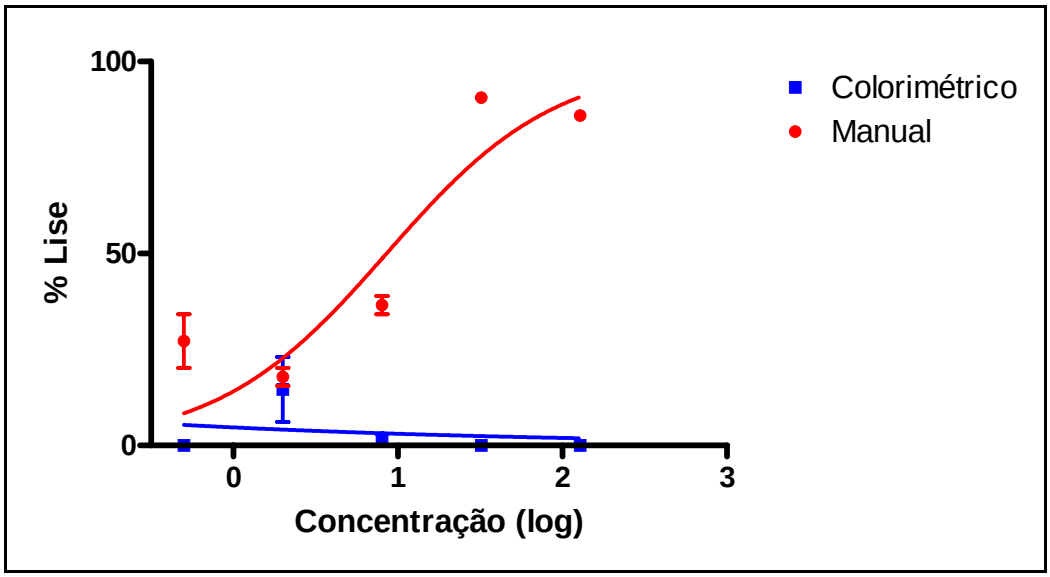

Figura 5. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres com o ácido ursólico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico utilizando DMSO em substituição ao isopropanol ácido.

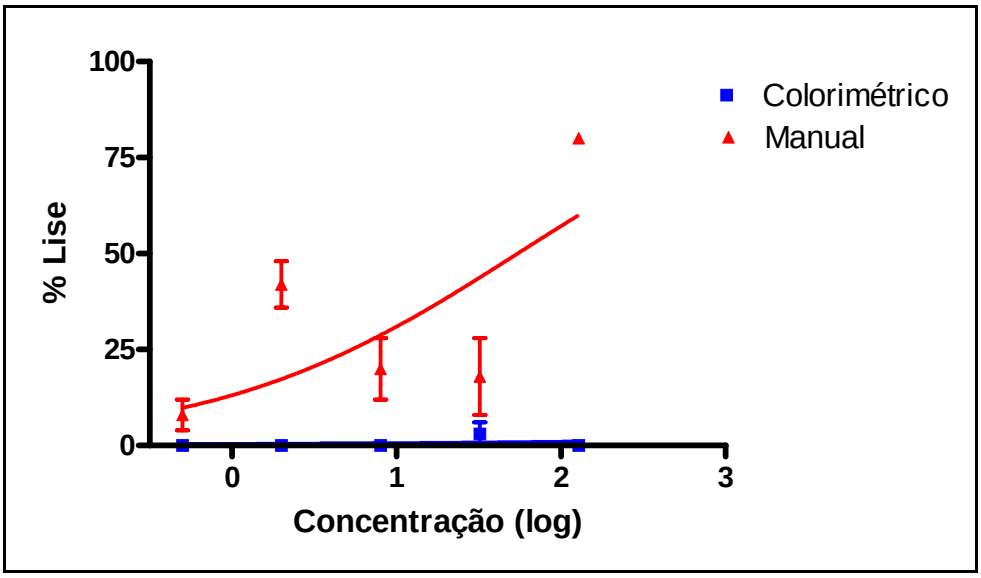

Figura 6. Porcentagens de lise das formas taquizoítas livres com o ácido oleanóico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico utilizando DMSO em substituição ao isopropanol ácido.

O estudo de Liu *et al*. (1997) demonstra que a redução do MTT a formazan não se restringe à mitocôndria. Na verdade, este processo ocorre com maior freqüência em diversas outras frações celulares, especialmente em vesículas que foram identificadas como sendo endossomos/lisossomos. Evidências indicam que as enzimas (denominadas MTT redutases) envolvidas na redução do MTT contém os grupos tiol e flavina.

4.4.2. Ensaio colorimétrico do Alamar Blue®

Além do MTT, outro método colorimétrico comumente encontrado na literatura para determinar viabilidade celular e de parasitas, entre outras aplicações já citadas (BÉNÉRÉ *et al*., 2007; ROLÓN *et al*., 2006; PETTIT *et al*., 2005; O'BRIEN *et al*., 2000) é o que utiliza a resazurin (Alamar Blue®). Devido aos resultados até o momento obtidos nos ensaios realizados com o MTT, tentamos empregar uma metodologia utilizando o Alamar Blue® para *T. gondii*. Entretranto, como ocorreu com o MTT, também observamos, através das Figuras 7 e 8, que não houve correspondência entre os valores de porcentagem de lise neste ensaio e da contagem manual.

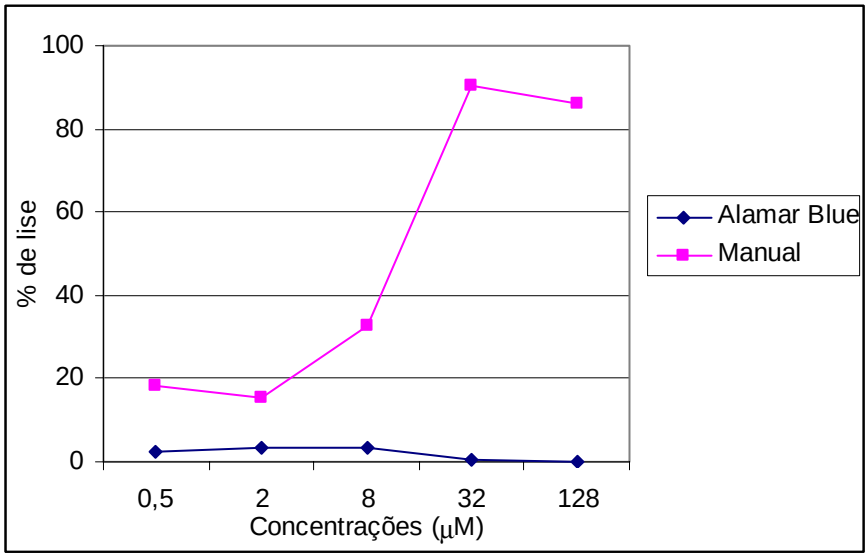

Figura 7. Porcentagens de lise do ácido ursólico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico com Alamar Blue®.

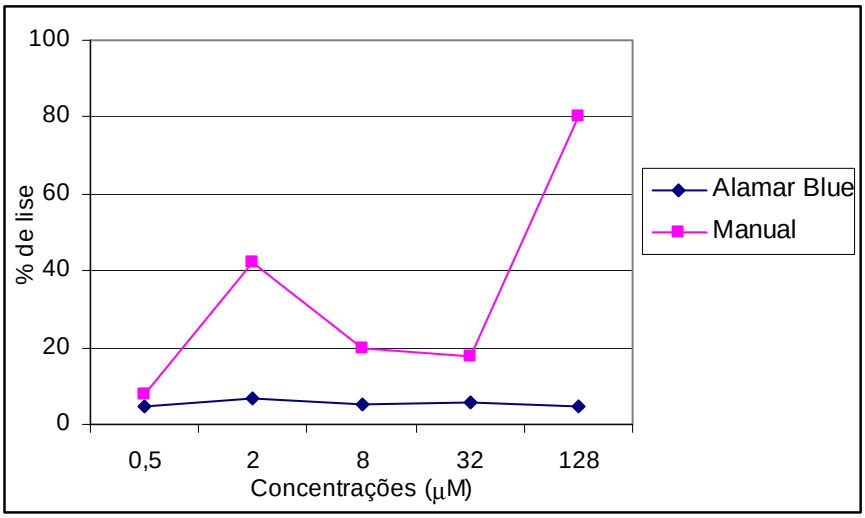

Figura 8. Porcentagens de lise do ácido oleanóico, na contagem manual e no ensaio colorimétrico com Alamar Blue®.

Considerando os resultados acima apresentados, os quais demonstram que *T. gondii* não metabolizou o MTT e o Alamar Blue®, e que possibilitamos, através do meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, as condições para manter a viabilidade do parasita durante o período de incubação com as drogas testadas, com a finalidade de que sua morte resultasse apenas da ação dos ácidos ursólico e oleanóico, seria possível que algum componente do meio de cultura estivesse inibindo o metabolismo do parasita, impedindo a realização dos ensaios colorimétricos.

Assim, modificações no meio RPMI 1640 utilizado na metodologia foram realizadas, a fim de verificar se tais interferências poderiam ser eliminadas. As modificações testadas foram: meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, HEPES, sem antibiótico; meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, com antibiótico, sem HEPES. Porém, nas duas tentativas o parasita continuou a não metabolizar o MTT, ou seja, não houve formação de cristais de formazan nem mesmo nos poços controle, que indicariam que o método estaria funcionando corretamente.

Eliminada a possibilidade da inibição do parasita por algum componente do meio de cultura, optou-se por verificar sua viabilidade no RMPI inicialmente utilizado e na suas modificações. Era esperado que *T. gondii* permanecesse vivo no meio de cultura líquido, já que ele é encontrado viável nos fluidos corporais. Para isto empregou-se a coloração pelo Azul de Tripan, e foi observado que em qualquer dos meios testados o parasita não se manteve viável por mais de 24 horas, o que é desejável para podermos afirmar que, se houver morte do parasita, que esta seja devido à ação da substância em teste, e não devido à falta de condições do meio de cultura para mantê-lo viável. Sendo assim, realmente não seria possível ocorrer a metabolização do MTT, explicando a ausência dos cristais de formazan. Além do ensaio colorimétrico, a contagem manual realizada (item 4.2., Tabela 2) também não é válida, pois nesta mesmo as formas visíveis ao microscópio encontravam-se inviáveis, já que o meio utilizado foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, que não mantém a viabilidade do parasita.

Räisänen (1978) avalia a viabilidade de formas taquizoítas livres de *T. gondii* em diferentes substratos, tal como soro de coelho em diferentes concentrações, colostro e solução fisiológica. Baseado em seus estudos realizamos nova modificação no meio RPMI 1640, sendo este suplementado com 30% de soro bovino fetal inativado, com HEPES e antibiótico, e com 50% de soro bovino fetal inativado, com HEPES e antibiótico, a fim de manter a viabilidade do parasita durante o ensaio com MTT. Antes, verificou-se novamente a viabilidade do parasita. Após 24 horas 90,47% encontravam-se viáveis no meio com 50% de soro e 78,40% viáveis no meio com 30% de soro. No ensaio do MTT utilizou-se então o meio suplementado com 50% de soro, porém neste também não houve metabolização do MTT, apesar da viabilidade do parasita estar garantida.

Duas possíveis explicações para este fato são: a membrana plasmática do parasita não permite a passagem do MTT para o seu interior; o parasita não possui a enzima envolvida no processo de metabolização do MTT a formazan, entretanto, nenhum trabalho relacionado foi encontrado para confirmar estas possibilidades.

A turvação ocorrida no ensaio colorimétrico do MTT, já anteriormente descrita, de acordo com Denizot *et al*. (1986), deve-se à adição do isopropanol com a finalidade de dissolver os cristais de formazan, porém, este causa a precipitação das proteínas presentes no soro bovino fetal. Para eliminar esta interferência o ideal seria não utilizar este complemento no meio RPMI, entretanto, observamos sua grande importância para a manutenção da viabilidade de *T. gondii* durante a realização de ensaios com formas taquizoítas livres.

4.5. Avaliação da quantidade de formas taquizoítas e do tempo de incubação empregados no ensaio do kit CyQUANT® NF (Invitrogen)

Observando a Figura 9, nota-se que há aumento direto e proporcional ao número de taquizoítas, já que a quantidade de DNA a ser marcada pelo reagente fluorescente também aumenta. Para o ensaio estabelecemos a utilização de $1,5x10^4$ formas taquizoítas por poço, mostrando esta uma detecção da fluorescência emitida adequada para o leitor da microplaca de 96 poços.

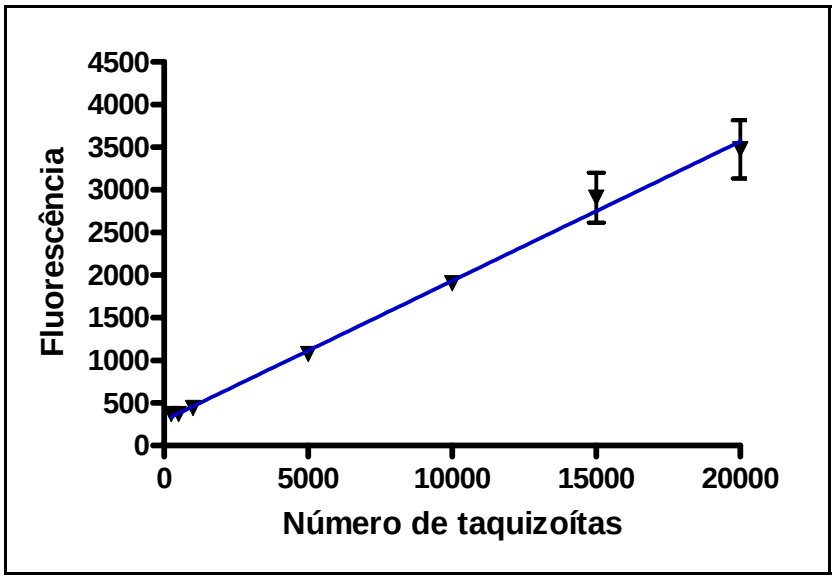

Figura 9. Curva de regressão linear da avaliação da determinação quantitativa de formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* empregadas no ensaio utilizando-se o Kit CyQUANT® NF (Invitrogen) (r^2 = 0,9565).

A variação da fluorescência mostra-se mínima nos diferentes tempos de incubação, como demonstrado na Figura 10. Apenas ligeiro aumento desta ocorre de 30 para 40 minutos de incubação após a adição do reagente fluorescente ao ensaio, mantendo-se inalterada até os 60 minutos de incubação. Portanto, determinou-se 40 minutos como o tempo de incubação ideal empregado.

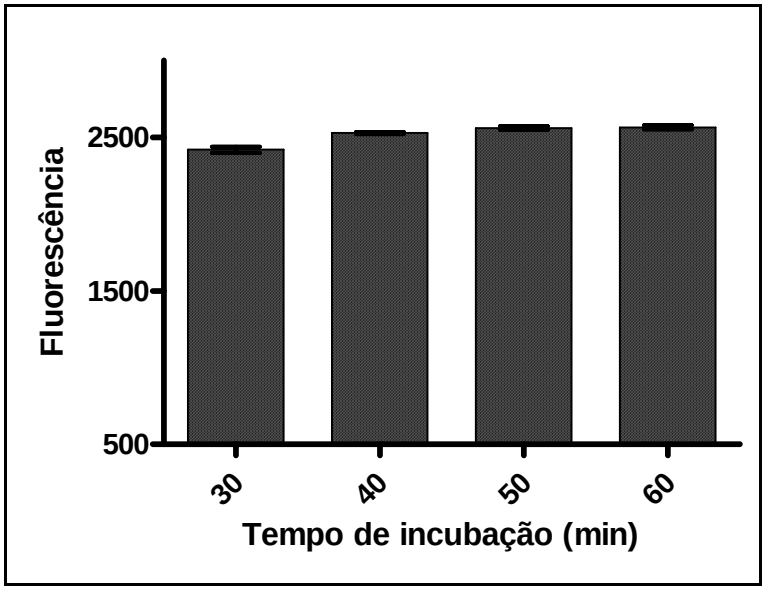

Figura 10. Avaliação do tempo de incubação ideal empregado no ensaio utilizando-se o kit CyQUANT® NF (Invitrogen).

Estabelecidos o número de formas e o tempo de incubação, prosseguiu-se com o ensaio utilizando os ácidos ursólico e oleanóico. Porém, a partir deste momento passamos a notar em parte das repetições do ensaio a ocorrência de lise das formas taquizoítas, mesmo nos poços controle, onde havia somente o solvente das substâncias (DMSO) em baixa concentração e não deveria, portanto, ser observado tal fato. Assim, pode-se afirmar que tanto este ensaio, como a contagem manual não são reprodutíveis, devido à dificuldade em manter a integridade do parasita em meio líquido, o qual se mostra sensível à adição que qualquer outro componente que não aqueles necessários para manter sua viabilidade em ambiente extracelular.

4.6. Ensaio *in vitro* sobre formas intracelulares de *Toxoplasma gondii*

4.6.1. Tratamento pós infecção de células Vero

4.6.1.1.Tratamento por 24 horas

Inicialmente foi proposto avaliar as concentrações de 0,5 a 128,0 μM do ácido ursólico, entretanto, como esta última apresentou elevada citotoxicidade, a atividade sobre as formas intracelulares foi verificada até a concentração máxima de 32,0 μM.

Como podemos notar na Figura 11, o ácido ursólico apresentou as maiores reduções na porcentagem de células infectadas, estatisticamente significativa quando comparada às concentrações correspondentes das demais substâncias avaliadas, com valores de $p<0,05$ e $p<0,001$. A combinação sulfadiazina + pirimetamina mostrou-se mais efetiva apenas na concentração de 128,0 μM, porém sem redução significativa se comparada ao ácido oleanóico.

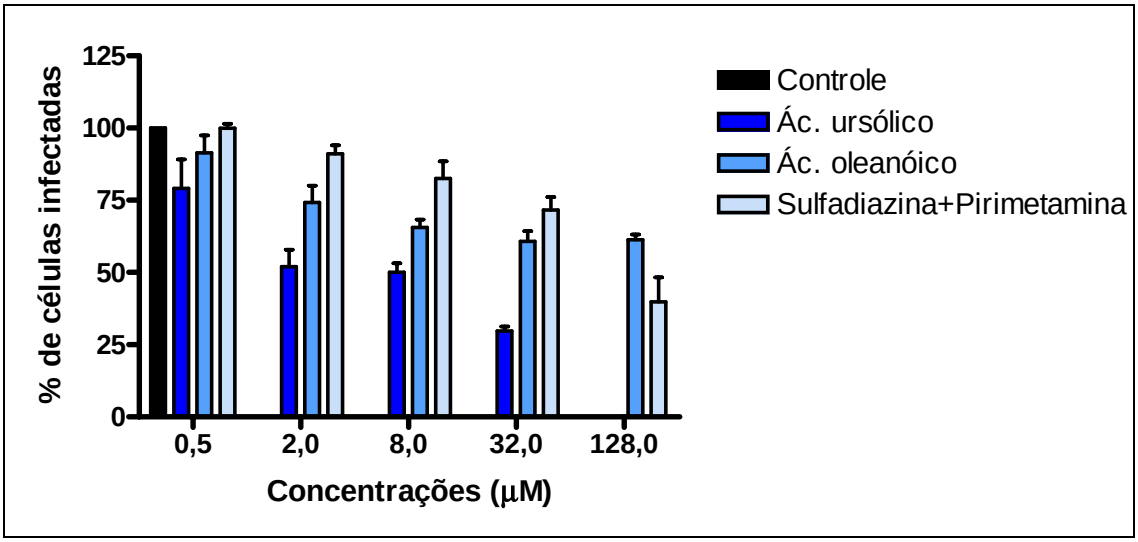

Figura 11. Relação entre a porcentagem de células infectadas no controle negativo (sem substâncias) e em cada uma das concentrações do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina+pirimetamina, após tratamento por 24 horas.

Todas as substâncias apresentaram diminuição estatisticamente significativa quando comparada ao controle infectado, sem qualquer tratamento, sendo que para o ácido ursólico isto ocorre a partir da concentração de 2,0 μM, para o ácido oleanóico a partir de 8,0 μM e para a combinação sulfadiazina + pirimetamina a partir de 32,0 μM, com valores de p demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Tratamento pós infecção de células Vero por 24 horas. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05.

	Comparação	Valor de p
Controle *vs*	2,0 µM; 8,0 µM e 32 µM ácido ursólico	p <0,001
	8,0 µM ácido oleanóico	p<0,01
	32,0 µM e 128,0 µM ácido oleanóico	p<0,001
	32,0 µM sulfadiazina+pirimetamina	p<0,05
	128,0 µM sulfadiazina+pirimetamina	p<0,001

Observando o valor de IC_{50} (Tabela 4), calculado através do gráfico (Figura 12) podemos afirmar que o ácido ursólico é a substância que se mostra potencialmente ativa sobre formas intracelulares de *T. gondii.*

Tabela 4. Valores de IC_{50} das substâncias avaliadas *in vitro.*

Substância	IC_{50} (µM)
Ácido ursólico	4,87
Ácido oleanóico	351,40
Sulfadiazina + Pirimetamina	80,50

Podemos notar na Figura 12 a atividade do ácido ursólico sobre formas intracelulares de *T. gondii*, indicando o aumento da porcentagem de células não infectadas, acompanhando o aumento da concentração desta substância, ocorrendo o mesmo para as demais substâncias.

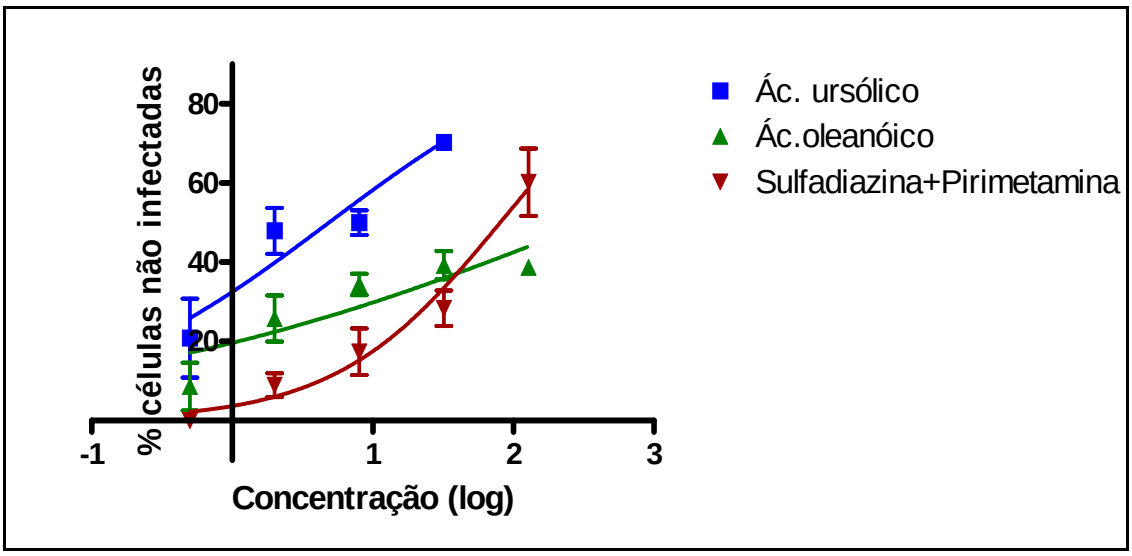

Figura 12. Curva de atividade do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina sobre formas intracelulares de *T. gondii*.

4.6.1.2.Tratamento por 48 horas

O tempo maior de contato com as substâncias avaliadas não resultou em diminuição mais acentuada na porcentagem de células infectadas do que a ocorrida no tratamento de 24 horas. Notamos nas concentrações de 32,0 μM e 128,0 μM da combinação sulfadiazina + pirimetamina que o número de células infectadas extrapolou o número destas no controle infectado (Figura 13). É possível que os parasitas não eliminados pela substância tenham se multiplicado no meio intracelular, o que explicaria o aumento da quantidade de células infectadas. Portanto, ao comparar os resultados obtidos nos tratamentos de 24 e 48 horas, não encontramos diferenças significativas.

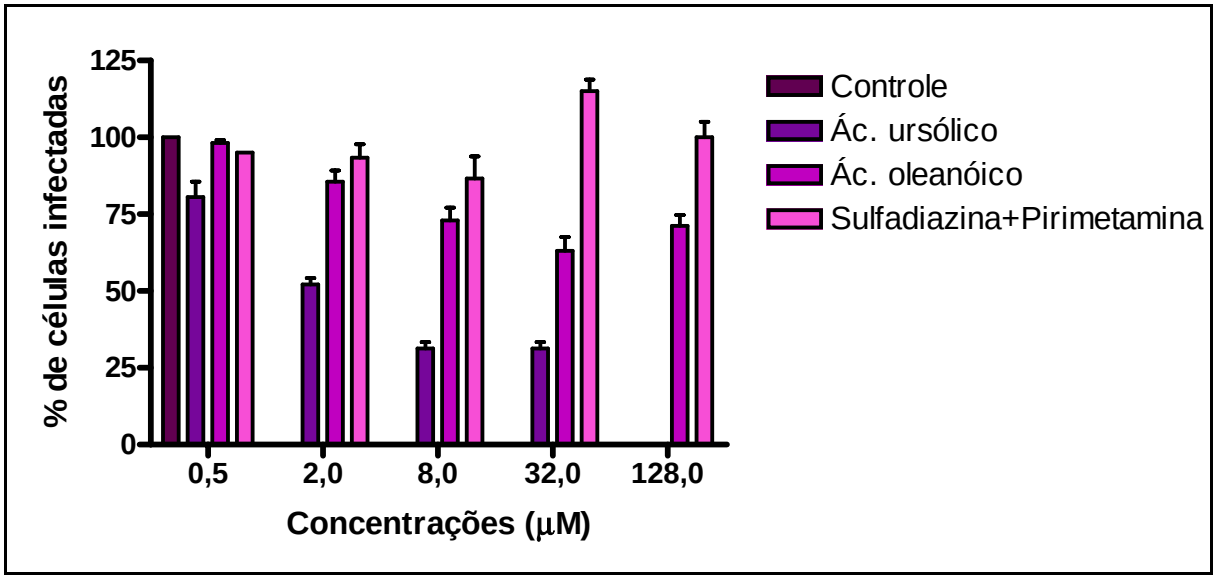

Figura 13. Relação entre a porcentagem de células infectadas no controle negativo (sem substâncias) e em cada uma das concentrações do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina, após tratamento por 48 horas.

Assim como no ensaio de 24 horas (item 4.6.1.1), o ácido ursólico apresentou as maiores reduções estatisticamente significativas na porcentagem de células infectadas, quando comparado ao controle infectado (Tabela 5). A combinação sulfadiazina + pirimetamina não mostrou diminuição significativa em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 5. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Tratamento pós infecção de células Vero por 48 horas. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05.

	Comparação	Valor de p
Controle *vs*	2,0 μM; 8,0 μM e 32 μM ácido ursólico	p <0,001
	8,0 μM ácido oleanóico	p<0,01
	32,0 μM e 128,0 μM ácido oleanóico	p<0,001

4.6.2. Pré-tratamento de formas taquizoítas por 1 hora e posterior infecção de células Vero

O objetivo deste ensaio foi avaliar a ação das substâncias sobre formas taquizoítas e a posterior capacidade destas de infectar células.

A substância que mostra maior atividade sobre o parasita ainda é o ácido ursólico, com diminuição mais acentuada na porcentagem de células infectadas que as demais substâncias (Figura 14) e estatisticamente significativa, demonstrada na Tabela 6.

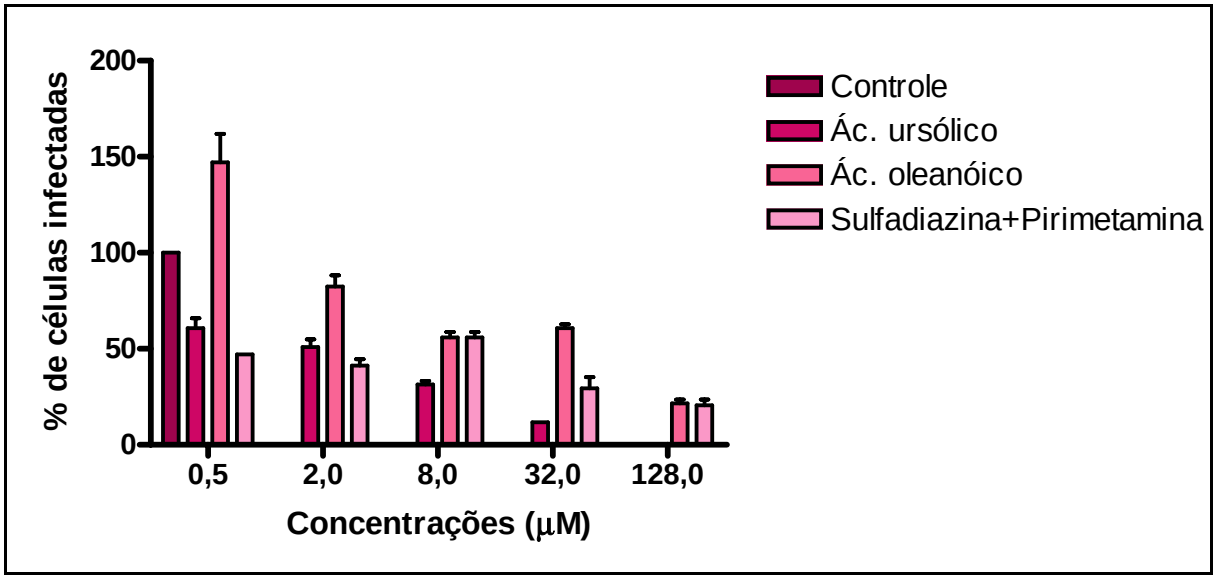

Figura 14. Relação entre a porcentagem de células infectadas no controle negativo (sem substâncias) e em cada uma das concentrações do ácido ursólico, ácido oleanóico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina, após pré-tratamento de formas taquizoítas e posterior infecção de células Vero.

Tabela 6. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Pré-tratamento de formas taquizoítas e posterior infecção de células Vero. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05.

	Comparação	Valor de p
Controle *vs*	2,0 μM; 8,0 μM e 32 μM ácido ursólico	p <0,001
	8,0 μM; 32,0 μM e 128,0 μM ácido oleanóico	p<0,001
	2,0 μM; 8,0 μM; 32,0 μM e 128,0 μM sulfadiazina+pirimetamina	p<0,001

Vemos também na Figura 14 que o ácido oleanóico e a combinação sulfadiazina + pirimetamina, apesar de não apresentar redução acentuada como o ácido ursólico, esta é significativa quando comparada ao controle infectado (Tabela 6). Comparando os resultados do tratamento pós infecção celular por 24 horas e do pré-tratamento das formas taquizoítas (Figura 15) houve diferenças significativas, mostrando principalmente maior ação do pré-tratamento sobre o parasita, indicadas na Tabela 7.

Tabela 7. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Relação entre o ensaio *in vitro* de tratamento pós infecção celular por 24 horas e o de pré-tratamento das formas taquizoítas. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05.

Comparação	Valor de p
0,5 mM ácido oleanóico – pós infecção *vs* 0,5 mM ácido oleanóico – pré-tratamento	p <0,001*
0,5 mM sulfadiazina+pirimetamina – pós infecção *vs* 0,5 mM sulfadiazina+pirimetamina – pré-tratamento	p<0,001**
2,0 mM sulfadiazina+pirimetamina – pós infecção *vs* 2,0 mM sulfadiazina+pirimetamina – pré-tratamento	p<0,001**
32,0 mM sulfadiazina+pirimetamina – pós infecção *vs* 32,0 mM sulfadiazina+pirimetamina – pré-tratamento	p<0,001**
128,0 mM ácido oleanóico – pós infecção *vs* 128,0 mM ácido oleanóico – pré-tratamento	p<0,001**

* Tratamento pós infecção celular apresenta maior redução de células infectadas
** Pré-tratamento de formas taquizoítas apresenta maior redução de células infectadas

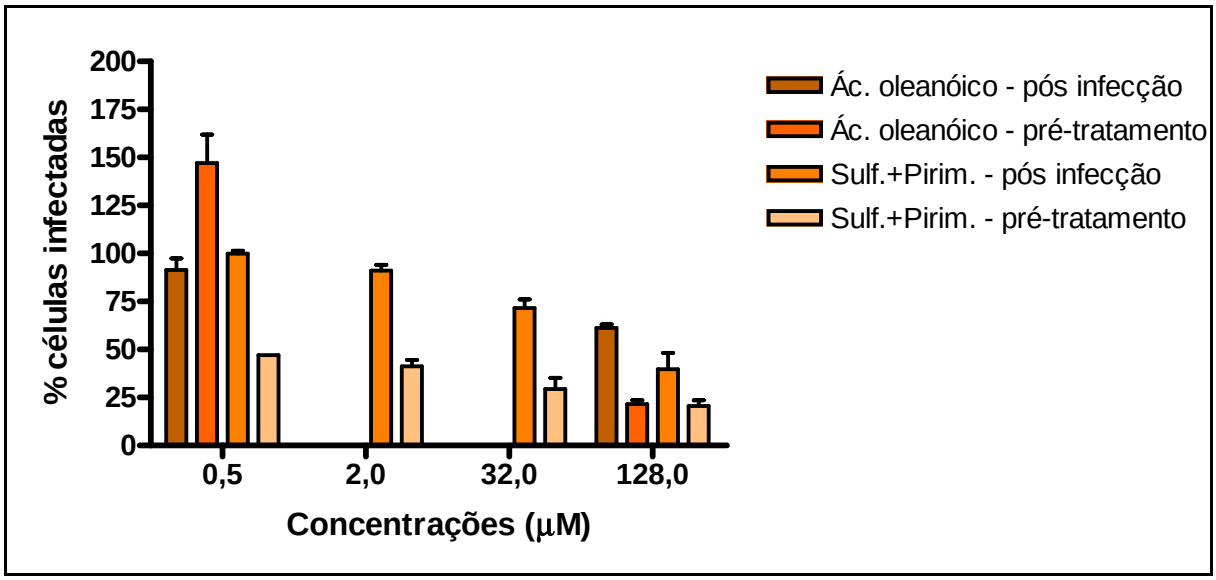

Figura 15. Relação entre a porcentagem de células infectadas no tratamento pós infecção celular por 24 horas e do pré-tratamento das formas taquizoítas de *T. gondii*.

A busca de metodologias para avaliação da bioatividade de substâncias sobre *T. gondii* disponíveis na literatura permite notarmos a limitação de protocolos para esta finalidade, principalmente devido à dificuldade em manter a viabilidade do parasita, o qual não suporta permanecer por longos períodos de tempo em ambiente extracelular. Assim, a contagem manual em células infectadas, utilizada neste trabalho e em outros estudos publicados, como de Bastos *et al.* (2008) e Dantas-Leite *et al.* (2004), é ainda a mais empregada. Outra metodologia disponível para este fim, a incorporação de timidina ^{3}H, presente no estudo de Mui *et al.* (2008), é uma alternativa possível, porém não comumente utilizada, pois esta base nitrogenada é radioativa, o que exige adequação especial para realização do ensaio. Alguns estudos determinam a atividades de substâncias diversas através de procedimentos onde o parasita permanece em contato com a substância a ser avaliada em uma suspensão líquida, por curtos intervalos de tempo, como por exemplo, de apenas 6 horas, descrito por Wei *et al.* (2008), garantindo que a morte do parasita tenha ocorrido apenas por ação da substância. Entretanto, seria interessante que este tempo de contato fosse maior, como proposto no presente estudo. Concluímos, todavia, que isto não é possível, em vista dos resultados obtidos.

4.7. Ensaio *in vivo*

Os ensaios *in vitro* mostram a potencial atividade do ácido ursólico sobre *T. gondii*, sugerindo desta forma verificar sua atividade *in vivo* em camundongos infectados. Porém, os resultados foram diferentes, pois a substância não foi capaz de diminuir o número de formas taquizoítas presentes no lavado peritoneal dos animais tratados, sendo este número ainda maior que o presente nos animais do grupo controle sem tratamento, o que observamos na Figura 16.

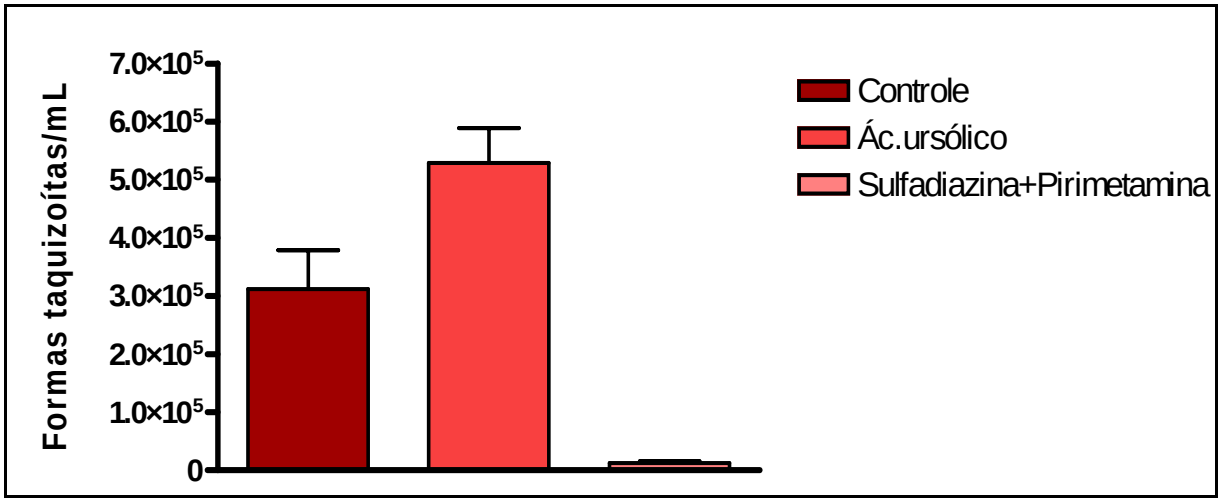

Figura 16. Número de formas taquizoítas encontradas em cada grupo de animais da avaliação *in vivo* da atividade do ácido ursólico e da combinação sulfadiazina + pirimetamina, comparados ao grupo controle (sem tratamento).

Este fato é confirmado também pela Tabela 8, onde vê-se que há redução significativa no número de formas taquizoítas do lavado peritoneal apenas quando se compara a combinação sulfadiazina + pirimetamina ao controle infectado e ao ácido ursólico.

Tabela 8. Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Ensaio *in vivo*. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05.

Comparação		Valor de p
Controle *vs*	Ácido ursólico	p >0,05
	Sulfadiazina + Pirimetamina	p<0,05
Ácido ursólico	Sulfadiazina + Pirimetamina	p<0,01

Para os resultados obtidos, é possível que duas situações estejam ocorrendo no sentido de se explicar a ineficácia do ácido ursólico: no ensaio *in vivo* é possível que o ácido ursólico sofra inativação em sua molécula inicial, ou seja, sofra metabolização, e seus metabólitos não possuam ação sobre o parasita, o que explicaria os resultados tão diversos dos ensaios *in vitro*.

A resposta imune não específica (tipo Th1) tem como principais citocinas o interferon gama (IFN-γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 12 (IL-12), sendo de grande importância na infecção por *T. gondii*, pois limita a proliferação do parasita no organismo hospedeiro, promovendo também a resposta imune específica (Th2).

O IFN-γ é produzido principalmente por células NK (natural killer) e linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, e tem diversas ações, entre elas ativação de macrófagos e células NK contra o parasita, ao mesmo tempo que promove a conversão de formas taquizoítas em bradizoítas, prevenindo a ruptura dos cistos teciduais por estas formadas.

O TNF-α é produzido por macrófagos, linfócitos T e mastócitos basófilos. Atua elevando a capacidade microbicida de macrófagos sobre *T. gondii* e induzindo a secreção de IFN-γ pelas células NK. Sua ação é essencial para ativação de macrófagos e inibição da multiplicação parasitária, porém estas ocorrem somente em sinergia com o IFN-γ.

A IL-12 é secretada por macrófagos e células dendríticas durante a estimulação por antígenos de *T. gondii*, ativando a produção de IFN-γ por células NK (FILISETTI & CANDOLFI, 2004).

Em modelo de artrite induzida em camundongos Balb/C fêmeas, Ahmad *et al*. (2006) relata a capacidade imunomodulatória do ácido ursólico sobre a exacerbada resposta Th1 responsável pelos efeitos deletérios da artrite. O autor mostra 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 conseqüência o efeito benéfico da substância no quadro de artrite.

Assim como na infecção por *T. gondii*, a resposta Th1 tem a mesma relevância na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Estudos da atividade *in vivo* do ácido ursólico em nosso laboratório de pesquisa (dados não publicados) indicam a diminuição da parasitemia quando animais infectados são tratados com baixas

doses, de 2,0 mg/kg/dia, porém, o aumento da dose eleva a parasitemia. Isto se explica pelo efeito imunomodolatório inibitório sobre a resposta Th1 anteriormente descrita. Entretanto, ao contrário dos benefícios obtidos na artrite pelo controle da exacerbação desta resposta imune, a inibição, tanto na fase aguda da infecção por *T. cruzi* quanto por *T. gondii*, torna-se prejudicial, pois compromete as defesas do organismo contra a proliferação do parasita. Talvez a dose de 7 mg/kg/dia seja alta o suficiente para causar o efeito previamente relatado.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1. A metodologia colorimétrica pelo MTT, pelo Alamar Blue®, do kit CyQUANT® NF e a contagem manual em meio líquido das formas taquizoítas do parasito em ensaios biológicos *in vitro* mostram-se inviáveis;

2. Há grande dificuldade em manter a integridade do parasita em meio líquido, o qual se mostra sensível à adição que qualquer outro componente que não aqueles necessários para manter sua viabilidade em ambiente extracelular;

3. O ácido ursólico mostra-se potencialmente ativo *in vitro* sobre formas intracelulares de *T. gondii*.

4. O tempo maior de contato *in vitro* de células infectadas com as substâncias avaliadas por um período de 48 horas não resultou em diminuição mais acentuada na porcentagem de células infectadas do que a ocorrida no tratamento de 24 horas.

5. O ácido ursólico não apresenta atividade sobre o parasita, quando administrado a camundongos infectados na dosagem de 7,0 mg/Kg/dia.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

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. 233-40. Mar. 2006.

ALEXANDER, J.; SCHARTON-KERSTEN, T.M.; YAP, G.; ROBERTS, C.W.; LIEW, F.Y.; SHER, A. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 352, n. 1359, p.1355-9. Sep. 1997.

BASTOS, L.M.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; VIEIRA, C.U.; TEIXEIRA, D.N.S.; HOMSI-BRANDENBURGO, M.I.; RODRIGUES, V.M.; HAMAGUCHI, A. *Toxoplasma gondii*: effects of neuwiedase, a metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom, on the invasion and replication of human fibroblasts *in vitro*. **Experimental Parasitology**, United States, v. 120, n. 4, p. 391-6. Dec. 2008.

BÉNÉRÉ, E.; da LUZ, R.A.I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 101-6. Nov. 2007.

BENOIT-VICAL, F.; SANTILLANA-HAYAT, M.; KONE-BAMBA, D.; MALLIE, M.; DEROUIN, F. Anti-toxoplasma activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. **Parasite**, Paris, v. 7, n. 1, p. 3-7. Mar. 2000.

BONFIOLI, A.A.; OREFICE, F. Toxoplasmosis. **Seminars in Ophthalmology**, United States, v. 20, n. 3, p. 129-41. Jul-Sep. 2005.

BOOTHROYD, J.C.; DUBREMETZ, J.F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature reviews. Microbiology**, England, v. 6, n. 1, p. 79-88. Jan. 2008.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current opinion in Microbiology**, England, v. 5, n. 4, p. 438-42. Aug. 2002.

BRENER, Z. Therapeutic activity and 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. Nov-Dec. 1962.

CARME, B.; BISSUEL, F.; AJZENBERG, D.; BOUYNE, R.; AZNAR,C.; DEMAR, M.; BICHAT, S.; LOUVEL, D.; BOURBIGOT, A.M.; PENEAU, C.; NERON, P.; DARDE, M.L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 40, n. 11, p. 4037-44. Nov. 2002.

CUI, Y.L.; HE, S.Y.; XUE, M.F.; ZHANG, J.; WANG, H.X., YAO, Y. Protective effect of a multiantigenic DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* with co-delivery of IL-12 in mice. **Parasite Immunology**, England, v. 30, n. 5, p. 309-13. May. 2008.

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**, Germany, v. 69, n. 5, p. 470-2. May. 2003.

DANTAS-LEITE, L.; URBINA, J.A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. Selective anti-*Toxoplasma gondii* activities of azasterols. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 23, n. 6, p. 620-6. Jun. 2004.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v.89, n.2, p.271-7. May. 1986.

DEROUIN, F.; SANTILLANA-HAYAT, M. Anti-*Toxoplasma* activities of antiretroviral drugs and interactions with pirimetamine and sulfadiazine in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 44, n. 9, p. 2575-7. Sep. 2000.

DIAS, N.; NICOLAU, A.; CARVALHO, G.S.; MOTA, M.; LIMA, N. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. **Journal of Basic Microbiology**, Germany, v. 39, n. 2, p. 103-8. Apr. 1999.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, Italy, v. 40, n. 1, p. 71-80. 2004.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Parasitologia humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 147-56.

LESCANO, S.A.; AMATO NETO, V.; CHIEFFI, P.P.; BEZERRA, R.C.; GAKIYA, E.; FERREIRA, C.S.; BRAZ, L.M. Evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine, for treatment of experimental infection of mice with *Toxoplasma*

gondii cystogenic strain. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 37, n. 6, p. 460-2. Nov-Dec. 2004.

LIU, J. Oleanolic and ursolic acid: research perspectives. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v.100, n.1-2, p.92-4. Aug. 2005.

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

LIU, K.Y.; ZHANG, D.B.; WEI, Q.K.; LI, J.; LI, G.P.; YU J.Z. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 12, n. 15, p. 2363-8. Apr. 2006.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, England, v. 69, n. 2, p. 581-93. Apr. 1997.

MÉVÉLEC, M.N.; BOUT, D.; DESOLME, B.; MARCHAND, H.; MAGNÉ, R.; BRUNEEL, O.; BUZONI-GATEL, D. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, Netherlands, v. 22;23, n. 36, p. 4489-99. Aug. 2005.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Germany, v. 86, n. 12, p. 999-1002. Dec. 2000.

MUI, E.J.; GUY, A.S.; MILHOUS, W.K.; HSU, H.; ROBERTS, C.W.; KIRISITIS, M.; MUENCH, S.; RICE, D.; DUBEY, J.P.; FOWBLE, J.W.; RATHOD, P.K.; QUEENER, S.F.; LIU, S.R.; JACOBUS, D.P.; McLEOD, R. Novel triazine JPC-2067-B inhibits *Toxoplasma gondii in vitro* and *in vivo*. **PLoS neglected tropical diseases**, United States, v. 2, n. 3, p. e190. Mar. 2008

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 267, n. 17, p. 5421-6. Sep. 2000.

PACHECO-SOARES, C; SOUZA, W. Redistribution of parasite and host cell membrane components during *Toxoplasma gondii* invasion. **Cell Structure and Function**, Japan, v. 23, n. 3, p.159-68. Jun. 1998.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Netherlands, v. 12, n. 3, p. 214-23. Jun. 2007.

PETTIT, R.K.; WEBER, C.A.; KEAN, M.J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G.R.; TAN, R.; FRANKS, K.S.; HORTON, M.L. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 49, n. 7, p. 2612-7. Jul. 2005.

POZIO, E. Highly active antiretroviral therapy and opportunistic protozoan infections. **Parassitologia**, Italy, v. 46, n. 1-2, p. 89-93. Jun. 2004.

RÄISÄNEN, S.A. The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: survival and pathogenity of *Toxoplasma gondii* trophozoites in liquid media. **Medical Hypotheses**, Scotland, v. 4, n. 4, p. 367-75, Jul-Aug. 1978.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Germany, v. 99, n. 2, p. 103-7. Jul. 2006.

ROMAND, S.; PUDNEY, M.; DEROUIN, F. In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 37, n. 11, p. 2371-8. Nov.1993.

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. 115-9. 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**, United States, v. 67, n. 10, p. 1697-700. Oct. 2004.

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: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Germany, v. 11, n. 2-3, p. 114-20. Feb. 2004.

van de VEN, E.S.; VREE, T.; MELCHERS, W.; CAMPS, W.; GALAMA, J. In vitro effects of sulfadiazine and its metabolites alone and in combination with pyrimethamine on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 39, n. 3, p. 763-5. Mar.1995.

WEI, L.L.; CHENG, Y.B.; SI, K.W.; GU, N.; LI, X.Q.; LI, C.; YUAN, Y.K. In vitro effect of (+)-usnic acid on *Toxoplasm gondii* tachyzoites. **Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, China, v. 26, n. 6, p. 438-41. Dec. 2008.

VILELA, K.J.C.; MELO, E.J.T. *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* arrested and leaded elimination of intracellular *Toxoplasma gondii*. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 2006. **Anais...** Nov. 2006. p. 194.

XUE, M.; HE, S.; CUI, Y.; YAO, Y.; WANG, H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, Netherlands, v. 57, n. 4, p. 424-9. Dec. 2008.

YIN, M.C.; CHAN, K.C. J. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, United States, v.55, n.17, p.7177-81. Aug. 2007.

ZHANG, J., HE, S.; JIANG, H.; YANG, T.; CONG, H.; ZHOU, H.; ZHANG, J.; GU, Q.; LI, Y.; ZHAO, Q. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. **Parasitology Research**, Germany, v. 101, n. 2, p. 331-8. Jul. 2007.

ZHOU, H.; GU, Q.; ZHAO, Q.; ZHANG, J.; CONG, H.; LI, Y.; HE, S. *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*. **Parasitology Research**, Germany, v. 100, n. 4, p. 829-35. Mar. 2007.