

GLEITON GONÇALVES DE SOUZA



**ESTRESSE OXIDATIVO E
CITOTOXICIDADE INDUZIDOS
POR IBUPROFENO EM
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) GLEITON GONÇALVES DE SOUZA.
Fernanda Ramos Gadelha
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular da área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Campinas
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89e

Souza, Gleiton Gonçalves
Estresse oxidativo e citotoxicidade induzidos por
ibuprofeno em *Trypanosoma cruzi* / Gleiton Gonçalves
Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Doença de Chagas. 2. Ibuprofeno. 3. Mitocôndria.
4. Espécies de oxigênio reativas. I. Gadelha, Fernanda
Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Oxidative stress and cytotoxicity induced by ibuprofen in *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave em inglês: Chagas' disease; Ibuprofen; Mitochondria; Reactive oxygen species.

Área de concentração: Bioquímica.

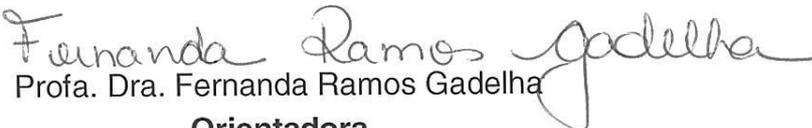
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Fernanda Ramos Gadelha, Celene Fernandes Bernardes, Sérgio Marangoni.

Data da defesa: 10/09/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

COMISSÃO JULGADORA


Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Orientadora


Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes

Prof. Dr. Armindo Antônio Alves

Prof. Dr. Cláudio Werneck

Agradecimentos

Acho que esta é a parte mais emocionante da tese, espero não esquecer-me de ninguém, pois fica difícil enumerar todas as pessoas que contribuíram para a conclusão do meu mestrado. Caso esqueça alguém me desculpem.

Agradeço em primeiro lugar ao Marcell, uma pessoa maravilhosa que esteve ao meu lado em todos os momentos, desde o início do meu mestrado. Uma pessoa que sempre esteve disposta a estender sua mão nos momentos em que mais precisei. Admiro bastante você...

Quero agradecer meu pai e minha mãe, que me incentivaram a fazer o mestrado e sempre, mesmo que de longe, me apoiaram nessa trajetória.

Ao pessoal do laboratório da professora Carmem, Ana, Paula, a Marília, e em especial ao Willian; agradeço à todos pelas contribuições na execução dos meus experimentos.

À Giovanna, pela atenção e disposição de ajudar com meus experimentos. Te admiro muito Gi, você vai longe.

Ao Wagner, pela flexibilidade no meu horário de trabalho, muitas vezes precisei sair mais cedo para assistir às aulas.

À Marcela e Alessandra, minhas psicólogas, que muitas vezes tiveram de ficar horas ouvindo meus desabafos, adoro vocês, foi um prazer enorme trabalhar com vocês duas.

Agradeço ao Kiko, pela enorme colaboração lá no laboratório, você desempenha muito bem seu trabalho por aí, nunca deixe isso acabar.

À Lígia, que foi uma pessoa fantástica, sempre disposta a me ajudar, e como ajudou. Li, desejo todo sucesso para você, espero termos uma oportunidade de trabalhar juntos novamente.

Ao Rapha, meu companheiro de mestrado, pelas várias vezes que segurou a barra...

E finalmente à professora Fernanda pela oportunidade de realizar o mestrado.

Souza, Gleiton Gonçalves de. Estresse oxidativo e citotoxicidade induzidos por ibuprofeno em *Trypanosoma cruzi*. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, uma enfermidade que ainda não possui uma cura efetiva. O tratamento é apenas sintomático, e até os dias atuais ainda é um problema de saúde pública. As drogas disponíveis contra a doença têm apenas atividade parcial sobre o protozoário, devido à baixa especificidade e à grande heterogeneidade das cepas; e, além disso, são tóxicas ao hospedeiro. O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos do ibuprofeno contra o *T. cruzi*, com o intuito de verificar a possibilidade desta substância se tornar uma alternativa para o tratamento da doença. Utilizamos nesse estudo, duas cepas com diferentes resistências ao estresse oxidativo, cepas Y e Tulahuen 2. Através das análises dos dados de proliferação celular após 48 h de tratamento, determinou-se a IC₅₀ para ambas as cepas, sendo 611 ± 22 µM de ibuprofeno para Tulahuen 2 e 879 ± 14 µM para Y. Com relação ao potencial de membrana mitocondrial, concentração de tióis totais e consumo de oxigênio, não houve alterações significativas quando as células foram tratadas com essa concentração por até 72h. O tratamento com ibuprofeno promoveu um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em ambas as cepas, sendo este mais pronunciado na Y nos tempos de 24 e 48 h. A produção de NADPH pela via das pentoses também foi avaliada verificando-se que no tempo de 24h não há diferença significativa entre as células tratadas e seus respectivos controles em ambas as cepas. Entretanto, nos tempos de 48 e 72 h esta diferença da atividade enzimática é significativa. Os resultados indicam que o ibuprofeno inicialmente não altera as funções mitocondriais e que o seu mecanismo de indução de morte deve estar relacionado a produção de EROs.

Palavras-Chaves: Doença de Chagas; Ibuprofeno; Mitocôndria; Espécies Reativas de Oxigênio

Souza, Gleiton Gonçalves de. Oxidative stress and cytotoxicity induced by ibuprofen in *Trypanosoma cruzi*. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas' disease, a disease that remains without an effective cure. Treatment is just symptomatic, and until the present days it is a public health problem. The available drugs have only partial activity on the protozoan, due its low specificity, as well as, the great heterogeneity of strains; and, besides that, they are toxic to the host. The purpose of this work was to analyse ibuprofen effect on *T. cruzi*, in order to verify if this drug could be used as a treatment for the disease. We studied two strains with different resistance to the oxidative stress, Y e Tulahuen 2 strains. After 48h of treatment, the IC₅₀ values were determined, 611 ± 22 µM for Tulahuen 2 and 879 ± 14 µM for the Y strain. Regarding the mitochondrial membrane potential, total thiols concentration and oxygen consumption, no significant differences were observed up to 72h of treatment. Ibuprofen treatment promoted a significant increase on reactive oxygen species formation (ROS) in both strains. The increase in ROS formation was higher after 24 and 48h of treatment. NADPH production by the pentose phosphate pathway was also determined. After 24h of treatment no significant differences were observed in both strains. However after 48 and 72h of treatment the difference was significant. The results indicate that ibuprofen treatment initially does not alter mitochondrial functions. And that its mechanism of action appears to be related to ROS formation.

Keywords: Chagas disease; Ibuprofen; Mitochondria; Reactive Oxygen Species

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Áreas endêmicas da doença de Chagas nas Américas	10
Figura 2 -	Esquema geral da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> mostrando as principais estruturas celulares	13
Figura 3 -	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 4 -	Fórmula Estrutural do ibuprofeno	21
Figura 5 -	Reações catalisadas pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase	25
Figura 6 -	Efeito do ibuprofeno na proliferação de <i>T. cruzi</i>	35
Figura 7 -	Proliferação do <i>T. cruzi</i> após tratamento com o fármaco.....	36
Figura 8 -	Efeito do ibuprofeno na viabilidade celular do <i>T. cruzi</i>	37
Figura 9 -	Consumo de oxigênio em células de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 10 -	Determinação do potencial de membrana mitocondrial em células de <i>T. cruzi</i> tratadas com ibuprofeno	40
Figura 11 -	Produção de EROs em células de <i>T. cruzi</i>	43
Figura 12 -	Atividade das enzimas G6PD e 6PGD em células de <i>T. cruzi</i> tratadas com ibuprofeno.....	45
Figura 13 -	Determinação de tióis totais em células de <i>T. cruzi</i> tratadas com ibuprofeno.	47

SUMÁRIO

1 Doença de Chagas	9
1.1 Histórico da doença	9
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.3 Transmissão	15
1.4 Patologia	16
1.5 Diagnóstico	16
1.6 Tratamento	17
1.6.1 Benzonidazol	18
1.6.2 Nifurtimox	19
2 Ibuprofeno	21
3 Mitocôndria	24
3.1 Características Bioquímicas	24
4 Objetivos	27
4.1 Geral	27
4.2 Específico.....	27
5. Materiais e Métodos	29
5.1 Cultura de células epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
5.2 Tratamento das células de <i>T. cruzi</i> com ibuprofeno	29
5.3 Determinação da citotoxicidade do ibuprofeno	30
5.4 Avaliação da proliferação celular	30
5.5 Determinação da IC ₅₀	31
5.6 Consumo de oxigênio	31
5.7 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	31
5.8 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio	32

5.9 Medida da atividade das enzimas G6PD e 6PGD	32
5.10 Determinação de tióis totais	33
5.11 Análise Estatística.....	33
6. Resultados e discussão	34
6.1 Avaliação da proliferação celular	34
6.2 Determinação da citotoxicidade do ibuprofeno	37
6.3 Consumo de oxigênio	38
6.4 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	40
6.5 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio	42
6.6 Atividade das enzimas G6PD e 6PGD	44
6.7 Determinação de tióis totais	47
7. Conclusão	49
Referências Bibliográficas	50
Anexos	58

1. Doença de Chagas

1.1 Histórico da doença

A história da doença de Chagas tem seu marco inicial em uma descoberta no interior do estado de Minas Gerais. No ano de 1909, o então pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Chagas, trouxe ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana. Apontando também seu agente transmissor (o *Triatoma infestans* – conhecido como “barbeiro”) e seu agente etiológico (que denominou de *Trypanosoma cruzi*). Esta nova descoberta constitui um marco histórico na ciência e na saúde brasileiras, pois, com a descoberta da doença, Carlos Chagas trouxe uma grande contribuição para a medicina tropical e para os estudos sobre as doenças parasitárias transmitidas por insetos-vetores no Brasil, trazendo ao conhecimento público a realidade sanitária do interior do país, acometido por algumas endemias (SILVA et al, 2001).

A doença, inicialmente de característica rural, tradicionalmente acometia pessoas de origem interiorana que habitavam casas de baixa qualidade, onde facilmente se alojava e colonizava o inseto vetor. Com o processo de urbanização das sociedades houve, também, uma “urbanização da doença”, aumentando a disseminação por meio de transfusões de sangue. Com cerca de 70% dos indivíduos infectados vivendo nas cidades, o risco de transmissão por transfusão sanguínea tornou-se muito alto. Com isso, a doença de Chagas passou da exclusividade do campo, a acometer também os grandes centros, instalando dessa forma um ciclo doméstico (DIAS, 2007).

Assim, com esta acentuada urbanização de indivíduos infectados, a incidência dessa moléstia tornou-se bastante elevada. Como dados de base, refira-se que nos anos 70 havia no Brasil mais de cinco milhões de pessoas afetadas pelo mal. Nas décadas subsequentes à sua descoberta os registros de novos casos eram de aproximadamente 100 mil por ano. A área endêmica, ou mais precisamente, com risco de transmissão da doença de Chagas, incluía 18 estados e mais de 2200 municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos domiciliados (BRASIL, 2005). Inquéritos sorológicos realizados entre 1989 e 1990, constataram

a existência de cerca de 6 milhões de pessoas infectadas, com uma prevalência estimada em 0,13% (BRASIL, 2002).

Na década de 80, diversos autores estimavam que a doença atingisse cerca de 18-20 milhões de indivíduos nas áreas endêmicas da América Latina. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), divulgados após encontro de especialistas na Argentina em 2005, indicaram a existência de 16-18 milhões de infectados pelo *T. cruzi* (WHO, 2005), contudo em recente publicação, Dias estima este número em 12-14 milhões de indivíduos na América Latina, sendo ainda encontrados indivíduos contaminados em países da Europa e América do Norte, na maioria das vezes resultante da migração de indivíduos infectados em busca de melhores condições de vida (DIAS, 2007). Estes dados mostram a inexistência de inquérito epidemiológico recente e indicam, como apontado pela OMS, a necessidade ainda atual de conhecimento da prevalência e incidência da doença. De qualquer modo, os números indicam a importância social da doença de Chagas em mais de 100 anos após sua descoberta. A Figura 1 apresenta, em preto, as áreas endêmicas da doença de Chagas nas Américas (ARGOLO et al, 2007).



Figura 1: Áreas endêmicas da doença de Chagas nas Américas (ARGOLO et al, 2007)

Algumas medidas vêm sendo tomadas, por parte do governo, no combate à doença. No ano de 2006 o Ministério da Saúde brasileiro recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (barbeiro), conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde (Opas). A eliminação da transmissão da doença de Chagas transmitida pelo "barbeiro" é resultado dos investimentos que o governo brasileiro tem feito em ações de controle do vetor. Nos anos de 2003 a 2006, o Ministério da Saúde investiu mais de R\$ 97 milhões em melhorias habitacionais, o que elimina as condições de instalação do "barbeiro" dentro das casas, em áreas rurais (BRASIL, 2006). Entretanto, na maioria dos casos, espécies de vetores anteriormente considerados secundários, ocuparam o seu lugar mantendo a população sob risco. Atualmente são conhecidas 120 espécies de vetores, sendo que destes 48 identificados no Brasil e destes 5 com especial importância na transmissão da doença ao homem. Ainda que iniciativas da OMS e de governos da América Latina tenham levado ao controle da transmissão vetorial da doença em diversas áreas endêmicas pelo seu principal vetor, o *Triatoma infestans*, a inexistência de vacina e de tratamento eficaz, principalmente para os pacientes com a forma crônica da doença, são ainda desafios a serem enfrentados (DIAS, 2007).

Apesar da eliminação da transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil, em muitos lugares da América Latina a transmissão vetorial do *T. cruzi* ainda ocorre. Em algumas destas regiões poderá não ser tão fácil eliminar a transmissão vetorial. Neste caso, os indivíduos vivem sob constante risco de contrair a doença de Chagas se outra opção de prevenção não lhes for dada. A situação destes indivíduos fica ainda mais difícil se for considerado que muitas cepas de *T. cruzi* não respondem ao tratamento com as drogas comerciais disponíveis. Assim, estes indivíduos não têm nem como se prevenir nem como se tratar da doença de Chagas. Nesta situação, o desenvolvimento de uma vacina ou de uma droga mais eficaz contra esta infecção poderiam ser as únicas formas de se reduzir a incidência da doença de Chagas (BRASIL, 2005).

Atualmente não existe vacina nem a perspectiva de um processo de imunização em larga escala num futuro próximo. Também, quanto ao tratamento, não existem drogas curativas. As mesmas drogas estão em uso há mais de 30 anos, sendo sua prescrição limitada pois somente alcançam a cura nos casos agudos e ainda assim produzem vários efeitos colaterais indesejáveis. Deste modo, o controle de vetores e das transfusões de sangue constitui ainda as

ferramentas mais importantes para evitar a transmissão e a disseminação da doença de Chagas para novas áreas (BRASIL, 2007).

Os dados mais recentes apontam que a doença de Chagas segue como problema de saúde pública, sobretudo nas grandes cidades da região sudeste, para onde convergiram pessoas infectadas pelo parasita, em busca de trabalho ou doentes em busca de tratamento. Diante disso, não se pode negligenciar os cuidados para com as pessoas infectadas, estejam elas com manifestações clínicas ou não. A doença de Chagas é a quarta causa de morte no Brasil entre as doenças infecto-parasitárias, sendo as faixas etárias mais atingidas acima de 45 anos (BRASIL, 2007).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um organismo unicelular, caracterizado pela presença de um único flagelo e pelo grande agregado de DNA mitocondrial, o cinetoplasto (Figura 2), o qual o caracteriza como pertencente à ordem Kinetoplastidea e à família Tripanosomatidae (da qual também fazem parte outros protozoários de importância médica como as *Leishmania* spp e *Trypanosoma brucei*) (DIAS, 1992). Reproduz-se assexuadamente por bipartição. No seu ciclo de vida, este parasita apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, alternando entre um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado (ARGOLO et al, 2007).

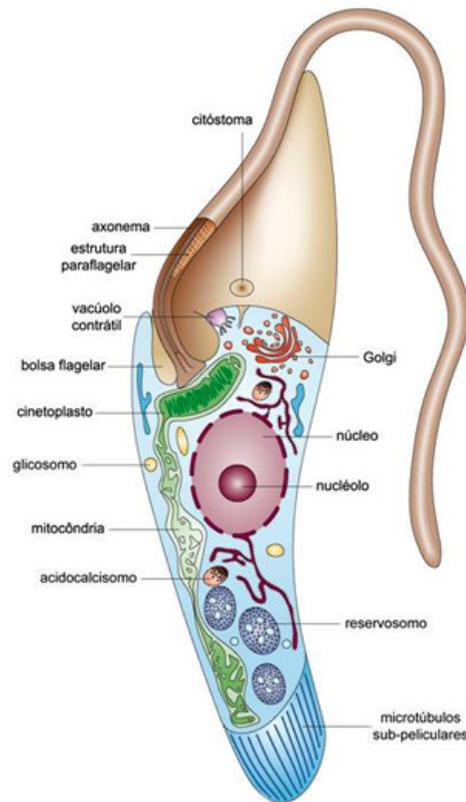


Figura 2: Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (SOUZA, 2002).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é apresentado na Figura 3 (WHO, 2004). Primeiramente, os “barbeiros”, hospedeiros intermediários do *T. cruzi*, se infectam com o parasita ao ingerir sangue de vertebrados infectados, contendo as formas tripomastigotas (1) aí encontradas. Ao chegar à porção anterior do intestino do invertebrado, as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas (2) e se multiplicam por toda a vida do hospedeiro. Quando chegam à luz do intestino posterior, elas sofrem uma nova metamorfose e transformam-se em tripomastigotas metacíclicas (3). Quando o triatomíneo pica o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (quando o inseto defeca para aumentar o espaço livre ao longo do seu tubo digestivo) as formas tripomastigotas metacíclicas são carregadas juntamente nas suas fezes e entram na lesão provocada pela picada do inseto ou pela abrasão na pele causada pela vítima ao coçar a ferida infectada. Uma vez no sangue do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas podem invadir vários tipos celulares, principalmente as fibras estriadas cardíacas e esqueléticas, as fibras

musculares lisas e as células nervosas. No interior destas células os tripomastigotas transformam-se em amastigotas (4), de forma redonda ou oval e que não apresentam flagelo, com grande capacidade de multiplicação. Finalmente, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas e rompem a célula hospedeira, ganhando a corrente sanguínea e podendo infectar tecidos de diferentes órgãos (BARRADAS et al, 2002).

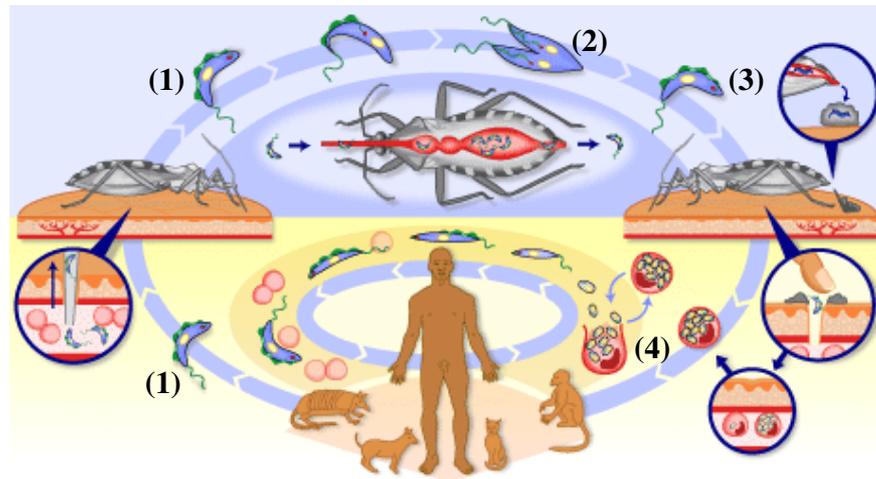


Figura 3: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2004). (1) formas tripomastigotas; (2) formas epimastigotas; (3) formas tripomastigotas metacíclicas e (4) formas amastigotas.

Um traço notável nas populações de *T. cruzi* é que elas exibem grande heterogeneidade, em termos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos (SILVEIRA, 2000). Essas diferenças intraespecíficas têm grande importância médica, uma vez que podem modular parâmetros como patogenicidade, sobrevivência, adaptabilidade (DVORAK et al, 1988), resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas (MURTA et al, 1998) e resistência ao estresse oxidativo (MIELNICZKI-PEREIRA et al, 2006).

1.3 Transmissão

A transmissão natural, ou primária, da doença de Chagas é a vetorial, que ocorre através das fezes dos triatomíneos, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”.

Apesar de haver mais de 120 espécies de triatomas, somente uma dezena de espécies tem importância epidemiológica como origem regular de infecção humana. O vetor cresce e multiplica-se em fendas das paredes, buracos dos telhados, debaixo e detrás dos móveis, dos quadros e outros pontos das residências com paredes de barro ou tijolo cru e telhados de palha ou junco. Os triatomíneos são insetos de hábitos noturnos e são fotossensíveis; saem à noite para se alimentar e reproduzir. Neste momento é que acontece a transmissão do parasita ao homem, via alimentação do hospedeiro invertebrado (BRENER et al, 2000).

Outra forma de transmissão da doença é através da transfusão do sangue de indivíduos não tratados ou daqueles em que o tratamento não foi efetivo (DIAS et al, 1998). A transmissão transfusional ganhou grande importância epidemiológica nas duas últimas décadas, em função da migração de indivíduos infectados para os centros urbanos e da ineficiência no controle das transfusões, nos bancos de sangue (BRASIL, 2006).

Existem, ainda, outras formas de infecção da doença. Por apresentarem uma baixa incidência, não apresentam grande importância para a Saúde Pública, como acidentes laboratoriais, transmissão congênita (GONTIJO et al, 2007). A transmissão congênita ocorre, mas muitos dos conceptos têm morte prematura, não se sabendo, com precisão, qual a influência dessa forma de transmissão na manutenção da endemia. Ocorrem ainda a transmissão acidental em laboratório e a transmissão pelo leite materno, ambas de pouca significância epidemiológica. Sugere-se a hipótese de transmissão, por via oral, em alguns surtos episódicos. Recentemente, foram relatados no Paraná casos da doença de Chagas na forma aguda, conseqüentes à transmissão por via oral após ingestão de caldo de cana contaminado com fezes de barbeiros (BRASIL, 2006).

1.4 Patologia

A doença de Chagas é uma doença de características peculiares. Os indivíduos com esta enfermidade podem apresentar, após um período variável de tempo, uma das quatro formas clínicas mais frequentes da doença: a forma cardíaca, a forma digestiva, a forma mista e a forma indeterminada. Porém, pouco ainda se conhece sobre os mecanismos imunes e patogênicos que estão envolvidos da fase aguda para a crônica, bem como os fatores que favorecem o desenvolvimento de uma determinada forma clínica (VERÇOSA, 2006).

A fase aguda da doença corresponde ao período inicial da infecção, podendo apresentar-se aparente ou inaparente. É definida basicamente pela alta parasitemia, tendo duração, geralmente, de três a oito semanas. Nos casos de transmissão vetorial, a fase aguda é caracterizada pela presença dos chamados *sinais de porta de entrada*, caracterizados por uma lesão furunculóide levemente elevada, não supurativa e avermelhada (Chagoma de inoculação) ou por um edema bpalpebral unilateral (sinal de Romanã); ambos correspondem a uma reação imunológica complexa à penetração e difusão do parasita (BRASIL, 2004). Na fase crônica da doença muitos pacientes podem passar um longo período, ou mesmo toda a sua vida, sem apresentar nenhuma manifestação, embora sejam portadores do *T. cruzi*. Em outros casos, após muitos anos na fase crônica e dependendo da área geográfica, cerca de 20 a 35% dos indivíduos infectados poderão desenvolver lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo, coração, esôfago e sistema nervoso periférico, nos quais prossegue ativamente até o fim da vida (MONCAYO, 2003).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia e pela avaliação dos sintomas clínicos e deve ser confirmado, quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial; este pode ser realizado por meio da busca do parasita no sangue ou da resposta imune do hospedeiro infectado, e os exames laboratoriais devem ser direcionados em função da fase da infecção.

Os testes laboratoriais de definição da doença de Chagas na fase aguda se baseiam em dois critérios: o Parasitológico, definido pela presença de parasitas circulantes demonstráveis no exame direto do sangue periférico ou o Sorológico, caracterizado pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico o que é considerado indicativo da fase aguda (BRASIL, 2005).

Na fase crônica, devido à parasitemia subpatente, os métodos parasitológicos convencionais são de baixa sensibilidade, o que implica em pouco valor diagnóstico, tornando desnecessária a sua realização para o manejo clínico dos pacientes. No critério sorológico, considera-se um indivíduo infectado na fase crônica aquele que apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, detectados por meio de dois testes distintos ou com diferentes preparações antigênicas (BRASIL, 2005).

1.6 Tratamento

Embora haja divergências quanto às percentagens de cura no tratamento etiológico da doença de Chagas, há consenso sobre sua utilidade, a depender de circunstâncias como a fase da doença e idade do paciente (BRASIL, 2005).

Muitos estudos se propuseram a encontrar uma droga eficaz no tratamento da doença. O surto de fármacos oriundos das descobertas que se seguiram após a segunda grande guerra (1939-1943) alcançou também a doença de Chagas. Séries de drogas foram testadas, a partir da década de 50, em animais e pacientes chagásicos sem êxito. Somente a partir de 1970 é que surgiram dois fármacos que atingiram o mercado, o benzonidazol e o nifurtimox (COURA et al, 2007).

No Brasil, o benzonidazol (Rochagan[®]) é a droga de escolha para o tratamento específico da doença de Chagas. O nifurtimox (Lampit[®]), existente na América Central, pode ser utilizado como alternativa em caso de intolerância ao benzonidazol. No caso de falha terapêutica com uma das drogas, apesar de eventual resistência cruzada, a outra pode ser tentada. A dose a ser administrada durante o tratamento varia de acordo com a idade do indivíduo (BRASIL, 2005).

O tratamento da doença se torna ainda mais difícil em virtude da grande variabilidade de cepas de *T. cruzi*, com diferentes níveis de virulência, parasitismo e, grande parte delas, resistência aos tratamentos convencionais (DEVERA et al, 2002).

A avaliação de cura da doença é dada pela negatividade sorológica dos exames laboratoriais, considerada como o único método tradutor de cura. Especialistas apontam que o tempo necessário para a negatificação é variável e depende da fase da doença, sendo um ano para a infecção congênita, de três a cinco anos para a fase aguda, de cinco a dez anos para a fase crônica recente e acima de 20 anos para a fase crônica de longa duração (BRASIL, 2005).

O tratamento específico pode ser feito em unidades ambulatoriais por um médico generalista que conheça as particularidades do medicamento e da doença de Chagas. Casos agudos sintomáticos podem necessitar de internação hospitalar.

1.6.1 Benzonidazol

É um derivado nitroimidazólico quimioterapeuticamente ativo contra o *T. cruzi*. Este fármaco, inicialmente produzido pela indústria farmacêutica Roche, e atualmente entre os direitos de produção ao Governo Federal, sob a denominação de Rochagan[®], foi introduzido no Brasil em 1978 (BURCHMORE et al, 2002).

Estudos feitos sugerem que o mecanismo de ação do Benzonidazol parece envolver uma diminuição da síntese de proteínas, redução de incorporação nos precursores de RNA e diminuição da incorporação de timidina em DNA (GOIJMAN et al, 1983). Na experiência clínica geral é dotado de evidente ação antiparasitária (BRENER et al, 2000). Alguns estudos mostram que, após tratamento das células de *T. cruzi* com esta droga, os níveis de tripanotona (TSH) caem drasticamente, uma vez que esta se encontra diretamente ligada aos processos de detoxificação das células de *T. cruzi*, tornado assim estas células mais susceptíveis ao estresse oxidativo (REPETTO, 1996). A TSH desempenha importante função nos mecanismos antioxidantes nas células de *T. cruzi*, seus mecanismos de atuação nestas células são similares ao da glutathiona (GSH) em células humanas (GREIG et al, 2006).

Em virtude da acentuada toxicidade às células sanguíneas, o benzonidazol não pode ser empregado em larga escala e requer acompanhamento laboratorial durante o seu uso. O

emprego do medicamento requer termo de consentimento esclarecido assinado pelo paciente ou por seus responsáveis (URBINA, 2002).

O benzonidazol tem sido empregado no tratamento específico de pacientes chagásicos na fase aguda, promovendo curas parasitológicas de 50 a 70%. No tratamento de pacientes chagásicos crônicos, os resultados são significativamente inferiores, devido ao número maior de parasitas intracelulares encontrados nesta fase (DE CASTRO et al, 2007).

1.6.2 Nifurtimox

Introduzido no mercado farmacêutico no ano de 1972 pelo Laboratório Bayer, com o nome de Lampit[®], o nifurtimox é um derivado nitrofurano utilizado no tratamento da doença de Chagas. Contudo, este medicamento, depois de amplamente usado, não se encontra mais disponível no Brasil devido à sua acentuada toxicidade às células sanguíneas do hospedeiro (MAYA et al, 2003). O mecanismo de ação desta droga é mediado por radicais livres que são gerados por ela, tais como ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio (VIODÉ et al, 1999). Sabe-se que a enzima tripanotona redutase dos tripanosomas reduz o grupamento nitroso destes compostos a radicais livres que são tóxicos para o parasita, já que este parasita tem um deficiente mecanismo de detoxificação. Entretanto o nifurtimox é um substrato pouco específico para esta enzima, apresentando também alta toxicidade em células de mamíferos (DENISE et al, 2001).

Em virtude da alta toxicidade dos tratamentos convencionais, são cada vez maiores os esforços na busca de uma terapia que seja menos agressiva às células do hospedeiro e que apresente uma maior eficácia e especificidade pelas células do parasita.

De um modo geral, o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária vem sendo estudada, pelo estabelecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular ou pela investigação de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças, uma vez que elas já foram submetidas a ensaios clínicos muito dispendiosos (URBINA, 2002)).

A despeito da extensa lista de diferentes classes de compostos que apresentaram atividade *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi* ao longo dos estudos, somente alopurinol, itraconazol, fluconazol e posoconazol foram submetidos a ensaios clínicos desde a introdução do nifurtimox e do benzonidazol. Este fato se deve em muitos casos pela inexistência de indicação forte do efeito

curativo e ao efeito potencial tóxico e/ou teratogênico das drogas estudadas. Mesmo sendo submetidos a ensaios clínicos, o alopurinol, o itraconazol, o fluconazol e o posoconazol não se mostraram mais eficazes que o nifurtimox e o benzonidazol contra o parasita. (DE CASTRO et al, 2007).

Uma outra perspectiva interessante, seria a elaboração de uma vacina contra esta moléstia, mas até os dias atuais não se tem métodos eficazes de imunização capazes de suprimir a infecção. Pesquisadores da Fiocruz e do Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica da Universidade Federal de São Paulo atualmente trabalham junto visando desenvolver uma vacina recombinante contra a doença de Chagas que estimulasse estes mecanismos de imunização. No momento esta vacina está em teste em cepas que resultam em cardiomiopatia crônica e, dependendo dos resultados, também será testada em modelo de infecção de primatas não humanos que reproduzem aspectos da infecção crônica pelo *T. cruzi* e da doença de Chagas (IMTEV, 2008).

2. Ibuprofeno

Como visto no capítulo anterior, as drogas atuais utilizadas para o tratamento da doença de Chagas apresentam alta toxicidade e baixa especificidade. E até o presente momento não se observa em estudo uma droga com futuro promissor no que se diz respeito ao tratamento da doença. Diante disso, nossa pesquisa buscou analisar possíveis ações do ibuprofeno sobre o parasita causador da doença.

O ibuprofeno é um composto do grupo dos derivados do ácido propiônico, um dos mais importantes grupos das drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINE). Foi uma das primeiras drogas desse grupo a ser utilizada e, atualmente, se encontra em franca expansão. Ibuprofeno é o nome genérico do α -Metil-4-(2-metil-propil) ácido benzenacético (Figura 5) (COSTA et al, 2006).

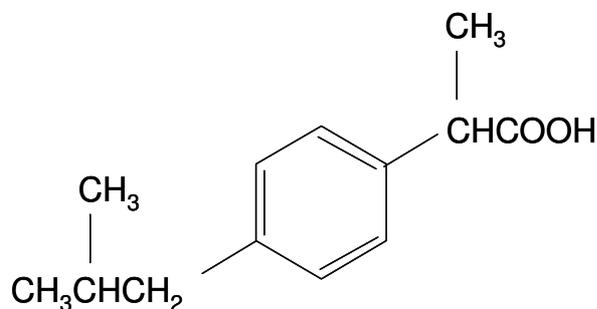


Figura 4: Fórmula estrutural do ibuprofeno (COSTA, 2006).

Os AINEs são drogas largamente prescritas para o tratamento de dores, febres e processos inflamatórios. Os derivados do ácido propiônico (ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno, fenoprofeno, indoprofeno) constituem um importante grupo de antiinflamatórios não esteroidais amplamente utilizados para o tratamento da dor, processos inflamatórios musculares e artrites (COSTA et al, 2006).

O mecanismo de ação do ibuprofeno, assim como os demais derivados do ácido propiônico, está atribuído à sua capacidade de inibição direta das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), enzimas chave na produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, os quais tem papel fundamental na resposta inflamatória e nos estímulos aos receptores da dor em seres humanos. O ibuprofeno se liga no sítio ativo destas enzimas impedindo assim a ligação do ácido araquidônico, seu substrato e sua posterior conversão em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, impedindo assim o processo de inflamação e dor. Além desse efeito sobre a síntese de prostaglandinas, impede a formação de cininas e histamina na mediação da inflamação (NEWA et al, 2008).

O ibuprofeno é administrado por via oral, absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal e, em cerca de 30 minutos, se dá o início da ação. Seu pico de concentração máxima no sangue ocorre cerca de duas a quatro horas após a ingestão, sendo de 23 a 45 µg/ml com uma dose de 400mg e de 56 a 66 µg/ml com administração da dose de 800mg (KOROLKOVAS, 2006).

Essa substância liga-se amplamente às proteínas plasmáticas para o transporte no plasma sanguíneo até seu sítio de ação. O tempo de duração do seu efeito é de cerca de quatro a oito horas, dependendo da dose ingerida. O ibuprofeno possui um tempo de meia vida de aproximadamente 1,8 a duas horas e sofre extensa metabolização hepática, sendo eliminado pela urina. A dose recomendada de uso é de 600 mg, três a quatro vezes ao dia, não devendo exceder a dose diária total de 3.200mg (NEWA et al, 2008).

Um efeito adverso desta droga é sua capacidade em proporcionar o aumento do estresse oxidativo no interior das células através da geração de radicais hidroperóxidos. Vários estudos apontam esta propriedade, ligada ao aumento de EROs em células hepáticas, células do trato gastro-intestinal humano, bem como interferência em processos de cicatrização (MCKEEVER et al, 2005; KAUSHAL et al, 2006).

Estudos recentes apontam a eficiência do ibuprofeno em desencadear mecanismos que levam à morte células tumorais. Palayoor (1998) descreve o uso de ibuprofeno associado à radiação gama como agente antitumoral em células carcinogênicas de próstata humana, das linhagens PC3 and DU-145, devido a sua capacidade em inibir a síntese de prostaglandinas por conta de sua interação com as enzimas ciclooxigenase 1 e 2. Isso sugere que a redução na síntese das prostaglandinas é necessária para a atividade antineoplásica do

ibuprofeno. Jakubiková (2001) aponta o ibuprofeno como um indutor de apoptose e necrose celular, bem como promotor de alterações no ciclo celular e modulador de crescimento de células leucêmicas humanas (THURNHER et al, 2001) Outros estudos vêm apontando a eficácia do ibuprofeno contra células de carcinomas prostáticos (ANDREWS et al, 2002; JOHNSON et al, 2002) e as várias linhagens de células leucêmicas como as células Walker 256 (CAMPOS et al, 2004).

Em todos os trabalhos envolvendo o uso do ibuprofeno contra células carcinogênicas, os autores descrevem que o mecanismo desencadeado por esta droga parece estar diretamente ligado com a indução de apoptose e necrose por diversas vias, elevação na geração de EROs, supressão na expressão de Bcl-2 na mitocôndria destas células e liberação do citocromo C (JAKUBIKOVÁ et al, 2001).

Com base nesses resultados, supõe-se que o ibuprofeno possa ser eficaz no combate às células de *T. cruzi*, uma vez que estas possuem baixa tolerância ao estresse oxidativo (MIELNICZKI-PEREIRA et al, 2006). A escolha, assim, pelo ibuprofeno foi feita devido ao fato de este já ser uma droga consagrada para o tratamento de outras doenças e já ter sido, ao longo de sua inserção no mercado, submetida a ensaios clínicos muito dispendiosos capazes de tornar conhecidos seus efeitos ao paciente. A escolha do ibuprofeno e não de outro composto da mesma classe, foi devido ao fato de ele ser mais facilmente encontrado no mercado em relação aos mesmos compostos do grupo dos derivados do ácido propiônico.

3. Mitocôndria

A principal característica das drogas utilizadas na quimioterapia da doença de Chagas é a geração de espécies reativas de oxigênio nas células de *T. cruzi*. A mitocôndria, organela responsável pela respiração celular, é a maior produtora de EROs e, também, o maior alvo desses radicais. Assim, a mitocôndria foi o alvo de nossos estudos.

3.1 Características Bioquímicas

O *T. cruzi*, bem como todos os membros da família Trypanosomatidae, apresenta uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo do protozoário. Igualmente a todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanossomatídeos é uma das organelas celulares de primordial função, importante para a respiração celular, através da cadeia respiratória (SALVIOLI et al, 1997).

A cadeia respiratória é capaz de gerar energia através da criação de um gradiente eletroquímico, o qual apresenta um potencial elétrico transmembrânico negativo da ordem de 180 a 200 mV, derivado do fluxo de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Esta energia é utilizada na biossíntese de ATP – molécula essencial em uma grande variedade de processos intracelulares (SALVIOLI et al, 1997). Por esta razão a análise da variação do potencial de membrana mitocondrial é um importante parâmetro para verificação da funcionalidade da mitocôndria e uma evidência indireta do status energético da célula (COSSARIZZA et al, 2001).

Apesar de necessária para uma variedade de processos intracelulares, a cadeia de transporte de elétrons faz da mitocôndria a maior organela produtora de EROs e também o maior alvo destes radicais. O estresse oxidativo e as EROs induzem diversos danos à célula o que acarreta, muitas vezes, o aparecimento de algumas enfermidades relacionadas ao ataque destes radicais em células humanas. As EROs promovem danos diretos às enzimas mitocondriais e são capazes de causar mutações no DNA mitocondrial. Podem, também, implicar em alterações no

potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), através de danos causados à bicamada lipídica da mitocôndria, os quais são indicadores de injúria na integridade da organela (JO et al, 2001).

Em condições normais, as células de *T. cruzi* possuem diversas vias de eliminação dos radicais superóxidos gerados pela cadeia respiratória. A melhor e mais importante via de detoxificação celular é mantida por superóxido dismutases (SODs) e pela TSH, um eficiente anti-oxidante e eliminador de radicais livres na célula. A TSH, assim como a GSH em humanos, é sintetizada no citosol e transportada à mitocôndria. Dentro da mitocôndria, a TSH é convertida em tripanotiona dissulfeto oxidada (TSST), durante reações de oxiredução. Como não pode ser exportada ao citossol a TSST é reduzida em TSH pela atividade da tripanotiona redutase, com o auxílio do NADPH. Este fato reflete a importância do NADPH produzido pela via das pentoses fosfato (PPP) como um fator crucial na regeneração da TSH (GREIG et al, 2006).

Uma enzima chave na via das pentoses fosfato, a glicose-6-fosfato desidrogenase, é considerada como a maior fonte de produção de NADPH, através da reação catalisada por ela, que é a conversão de seu substrato glicose-6-fosfato ao produto, 6-fosfogluconato com redução de NADP^+ à NADPH. Uma outra enzima, também presente na mesma via, capaz de promover a redução de NADP^+ à NADPH, é a 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD). A regeneração do NADP^+ à sua forma reduzida proporcionada por esta enzima ocorre durante a reação catalisada pela mesma (BANKI et al, 1999; FRANK, 2005). Na figura 6 podemos observar as reações catalisadas pelas duas enzimas.

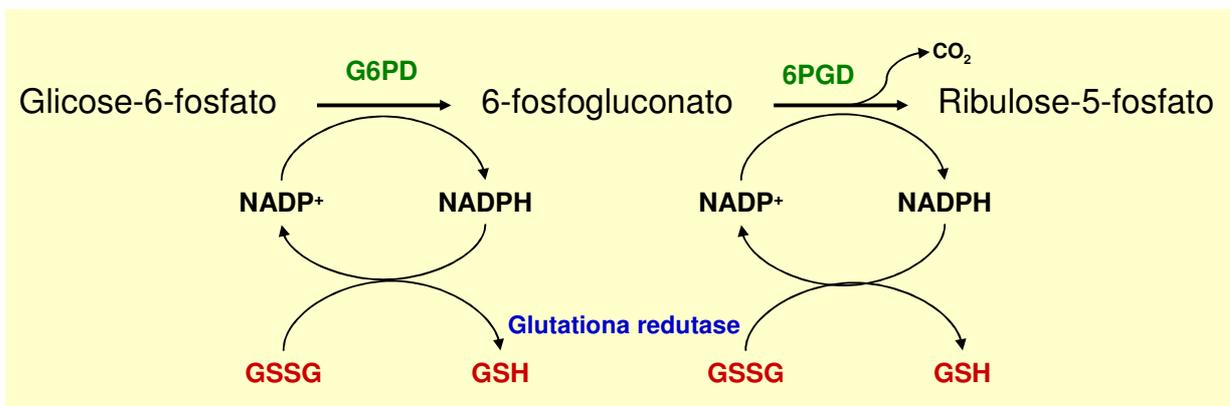


Figura 5: Reações catalisadas pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase (FRANK, 2005).

Deste modo uma das mais importantes funções da via das pentoses fosfato é de manter a TSH em seu estado reduzido proporcionando proteção aos grupos sulfidrílas e mantendo a integridade celular contra os efeitos agressores dos radicais livres (PRATHALINGHAM et al, 2007).

Em *T. cruzi*, a via das pentoses fosfato se comporta de forma semelhante ao que ocorre em células de mamíferos, apresentando variações na atividade de algumas enzimas para as diferentes cepas do parasita. Em algumas cepas esta via de utilização de glicose está mais ativa que em outras cepas, o que possivelmente caracteriza a diferença de resistência e virulência entre as cepas (MAUGERI et al, 2004).

4. Objetivos

4.1 Geral

Estudos recentes apontam a utilização do ibuprofeno contra diversas linhagens de células cancerosas. O mecanismo de morte celular parece estar ligado à capacidade desta substância em provocar um aumento na geração de radicais livres nestas células. Assim, sabendo que as células de *T. cruzi* possuem um sistema de detoxificação celular limitado contra os radicais livres, resolvemos estudar o efeito do ibuprofeno sobre as células do parasita e o impacto sobre sua mitocôndria, uma vez que esta organela é conhecidamente a principal produtora e também o maior alvo dos radicais gerados. Com base nessas características do ibuprofeno e conhecendo a susceptibilidade das células de *T. cruzi* ao estresse oxidativo, supõe-se que esta droga pode nos levar à uma nova possibilidade de terapia contra estes parasitas. A escolha das cepas Tulahuen 2 e Y foi baseada no fato de que estas possuem diferenças conhecidas na susceptibilidade e resistência ao estresse oxidativo, assim permitindo a avaliação em cepas com comportamentos distintos perante a produção de radicais livres.

4.2 Específico

Avaliar os efeitos citotóxicos do ibuprofeno sobre as duas cepas escolhidas para este estudo, analisando a capacidade de proliferação destas células, *in vitro*, na presença e na ausência da droga. E posteriormente avaliar a viabilidade celular das duas cepas, em ambas as condições. Também verificar se a droga possui efeitos citostáticos, analisando a capacidade de proliferação das células, que antes estavam na presença da droga, retirando-se esta do meio onde se encontram as células.

Com este estudo visamos também verificar a capacidade da droga em aumentar os radicais hidropéroxidos, os quais são capazes de gerar estresse oxidativo nas células. E

também a produção de NADPH pela via das pentoses fosfato, uma vez que a cascata de detoxificação celular contra os estes radicais é dependente da produção destas coenzimas. Avaliamos também a concentração de tióis livres totais nas células com o intuito de verificar se a geração destes radicais se encontra em níveis capazes de interferir nas estruturas protéicas.

Com o objetivo de verificar os efeitos do ibuprofeno sobre a integridade da mitocôndria do parasita, avaliamos a bioenergética mitocondrial através do consumo de oxigênio e do potencial de membrana gerado por esta organela.

5. Materiais e Métodos

Neste capítulo, serão descritos os materiais e métodos utilizados na pesquisa. Visando uma melhor organização, a composição de todos os meios de cultura e soluções está descrita no Anexo I.

Para maior confiabilidade dos experimentos, todos foram repetidos, no mínimo, três vezes em dias diferentes. Nos ensaios de atividade enzimática, em cada dia foram feitas medidas em duplicata.

5.1 Cultura de células epimastigotas de *T. cruzi*

Células das cepas Y e Tulahuen 2 ($5,2 \times 10^6$ células/ml) foram cultivadas à 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) acrescido de hemina, contendo 10% de soro fetal bovino inativado (Camargo, 1964). No quinto dia após a inoculação, os parasitas foram coletados por centrifugação (5 minutos a 2500 rpm, à 4°C) e lavados com tampão fosfato salino pH 7,2 (PBS) para realização dos experimentos. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (CAMARGO, 1964).

5.2 Tratamento das células de *T. cruzi* com ibuprofeno

Para a determinação da citotoxicidade do ibuprofeno e avaliação da proliferação celular, 1×10^6 células/ml foram incubadas, em meio LIT, à 28°C por 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações de ibuprofeno (0 a $2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

No experimento de avaliação citostática, após o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos à 2500 rpm e à 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em meio LIT e alíquotas foram retiradas para realizar a contagem das células em câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 horas.

Para os demais experimentos, foi usada a concentração de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da droga. Após o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada por 5 min à 2500 rpm e à 4°C . O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se 500 μl de PBS para ressuspender as células e alíquotas foram retiradas para realizar a contagem das células em câmara de Neubauer.

5.3 Determinação da citotoxicidade do ibuprofeno

A citotoxicidade do ibuprofeno sobre as células foi avaliada através do método do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Essa é uma técnica colorimétrica baseada na redução do MTT ao composto Formazan (MUELAS-SERRANO et al, 2000).

Após o tratamento das células, como descrito no item 3.2, 1×10^7 células/ml foram expostas à 2,5 mg/ml de MTT pelo período de 1,5 horas. Decorrido este tempo, adicionou-se 1 ml de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % em HCl 0,01 M, e incubou-se por 30 minutos, para dissolução dos sais de formazan formados. A suspensão foi centrifugada e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm (MUELAS-SERRANO et al, 2000).

5.4 Avaliação da proliferação celular

Epimastigotas (1×10^6 células/ml) foram cultivadas em meio LIT na presença de diferentes concentrações de ibuprofeno (0, 250, 500, 1000 e $2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas). Utilizou-se a temperatura de 28°C com agitação em shaker à 50 rpm na incubação. Nos tempos determinados, alíquotas foram retiradas para contagem do número de células em câmara de Neubauer (CARNIERI et al, 1993).

5.5 Determinação da IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da proliferação)

Com os dados obtidos na avaliação da proliferação celular foi calculada a concentração capaz de inibir a proliferação em 50% das células (IC₅₀). Os dados foram compilados em uma planilha do Microsoft Excel®, plotados em um gráfico (% de inibição x concentração de ibuprofeno) e a equação da reta determinada.

Uma vez com a equação da reta determinada o cálculo da IC₅₀ pode ser determinado, conforme descrito por Kelly e colaboradores (1993).

5.6 Consumo de oxigênio

Após tratamento com o ibuprofeno, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS e ressuspensas em 1 ml de meio de respiração. Realizou-se a medida do consumo de oxigênio pelas células (3×10^7 células/ml), em oxígrafo (Yellow Springs Instruments Co.). Para efeito de comparação, o experimento também foi realizado com células não previamente tratadas com o ibuprofeno. O consumo de oxigênio pelas células foi expresso em nanomoles de O₂/minuto/10⁷ células (VERCESI et al, 1991).

5.7 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado por meio da técnica de citometria de fluxo, utilizando DioC₆ (3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) como sonda (0,3 nmol.L⁻¹) (ZECCHIN et al, 2007).

As células (1×10^6 células/ml) tratadas com 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ibuprofeno por 24, 48, e 72 horas, conforme descrito no item 3.2, foram adicionadas em PBS, na presença da sonda (DioC₆) (3)¹. Realizou-se as leituras em citômetro de fluxo. Os tubos foram acrescidos de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CCCP (carbonyl cyanide m-cloro phenyl hydrazone), um desacoplador que dissipa

¹ Exceto no tubo referente ao background.

o potencial elétrico da membrana mitocondrial. Foi obtida a razão $F/F_{[CCCP]}$, que representa o potencial gerado pela membrana da organela (CAMPOS et al, 2004).

5.8 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio

As cepas Y e Tulahuen 2 foram tratadas com $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas conforme descrito no item 3.2. Feito isso, foram lavadas com PBS e 1×10^6 células/ml incubadas à 28°C por 45 minutos com $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de dihydroethidium (DHE - uma sonda utilizada para detecção da geração de radicais superóxido (O_2^-)). Por fim, analisou-se por citometria de fluxo (DEGASPERI et al, 2006).

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (u.a.).

5.9 Medida da atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD)

A atividade enzimática da G6PD e da 6PGD foi determinada através da quantidade de NADPH produzida. As células tratadas com ibuprofeno ($250 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) foram lavadas com PBS, centrifugadas e ressuspendidas em PBS.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em meio contendo PMSF ($0,1 \text{mmol.L}^{-1}$) e coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail Set III – Calbiochem[®]). A concentração do coquetel de inibidores de protease foi calculada para que se obtivesse $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de leupeptina num estoque final de, no máximo, 4×10^8 células/ml. Utilizaram-se $2,5 \times 10^6$ células/ml. As reações foram monitoradas espectrofotometricamente à 340nm pela produção de NADPH ($\epsilon_{340} = 0,0062 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (SWETHA et al, 2007).

Na medida da atividade da 6PGD, o meio de reação foi acrescido de NADP^+ ($250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ – concentração final) e 6-fosfogluconato (1mmol.L^{-1} – concentração final). A medida da atividade combinada da 6PGD e da G6PD foi realizada da mesma forma, acrescida de glicose-6-fosfato (1mmol.L^{-1}) (MIELNICZKI-PEREIRA et al, 2006).

A atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase foi obtida através da diferença da quantidade de NADPH, obtida pela enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, da quantidade total produzida pelas duas enzimas, como mostra a fórmula abaixo:

$$(G6PD + 6PGD) - 6PGD = G6PD$$

5.10 Determinação de tióis totais

As células (1×10^6 células/ml) tratadas com ibuprofeno ($250 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por 24, 48 e 72 horas foram lavadas e ressuspensas em PBS, acrescidas de 1 ml de ácido perclórico ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) e deixadas em gelo por 30 minutos. Após este tempo, acrescentou-se $50 \mu\text{l}$ de solução de KOH (3 mol.L^{-1}) e $50 \mu\text{l}$ de KHCO_3 (3 mol.L^{-1}) e a suspensão celular foi centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado solução contendo fosfato (3 mol.L^{-1}) pH 9,0 e $100 \mu\text{l}$ de reagente de ELLMAN 3 mmol.L^{-1} (5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato - DTNB), procedendo-se análise espectrofotométrica à 412 nm (KRIEGER et al, 2000).

5.11 Análise estatística

Para as análises estatísticas dos experimentos foi utilizado o software Origin ® versão 7.2. Realizou-se teste t , onde $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

6. Resultados e Discussão

6.1 Avaliação da proliferação celular

Os experimentos de proliferação celular tiveram três objetivos: 1) verificar a atividade da droga sobre a proliferação das células de *T. cruzi*; 2) determinar a IC₅₀ – concentração capaz de inibir 50% da proliferação; 3) avaliar a correlação *tempo x dose* a ser aplicada nos experimentos posteriores para duas cepas de *T. cruzi*, Tulahuen 2 e Y, devido diferenças conhecidas entre as duas cepas na susceptibilidade e resistência ao estresse oxidativo (MIELNICZKI-PEREIRA et al, 2006).

Através da análise dos dados obtidos com a proliferação celular (Figura 6), foi possível observar que a ação da droga sobre as células é dose e tempo dependente, ou seja, quanto maior a dose de incubação (0 a 2000 µM) e o tempo de exposição do parasita à droga, menor a proliferação celular. Os gráficos abaixo mostram as curvas de inibição no crescimento das células de ambas as cepas – Y e Tulahuen 2, em meio de cultura. Pela análise dos gráficos foi possível determinar o valor da IC₅₀ no tempo de 48h, para ambas as cepas, sendo 611 ± 22 µM da droga para a cepa Tulahuen 2 e 879 ± 14 µM para a cepa Y.

Com a avaliação da correlação dose x tempo verificou-se que a concentração de 100µM não apresentou resultados significativos sobre a proliferação celular, nos diversos tempos de tratamento. A concentração de 250µmol.L⁻¹ foi escolhida para ser aplicada e analisada em todos os experimentos posteriores, pois se encontra abaixo da IC₅₀ (611 µmol.L⁻¹ para a cepa Tulahuen 2 e 879 µmol.L⁻¹ para a cepa Y no tempo de 48 horas) e da dose capaz de apresentar efeitos tóxicos no plasma sanguíneo (704 mg/l ou 3mmol.L⁻¹) (KOROLKOVAS, 2006). Além disso, mostrou-se mais eficaz do que a dose de 100µmol.L⁻¹, a qual é geralmente utilizada para obter efeitos farmacológicos. Para se obter uma concentração plasmática de 250 µmol.L⁻¹ é necessário, a administração oral de uma dose de cerca de 1,1 mg (TANG et al, 1996, 1997).

Um segundo experimento teve o intuito de verificar se mesmo depois de retirada a pressão da droga sobre as células de *T. cruzi*, ela ainda deixava alguma ação residual nas funções celulares. Tratamos as células com ibuprofeno durante 48 horas. Após esse tempo, a

droga foi retirada e foi avaliada a proliferação das células a cada 24 horas, por um período total de 96 horas (Figura 7).

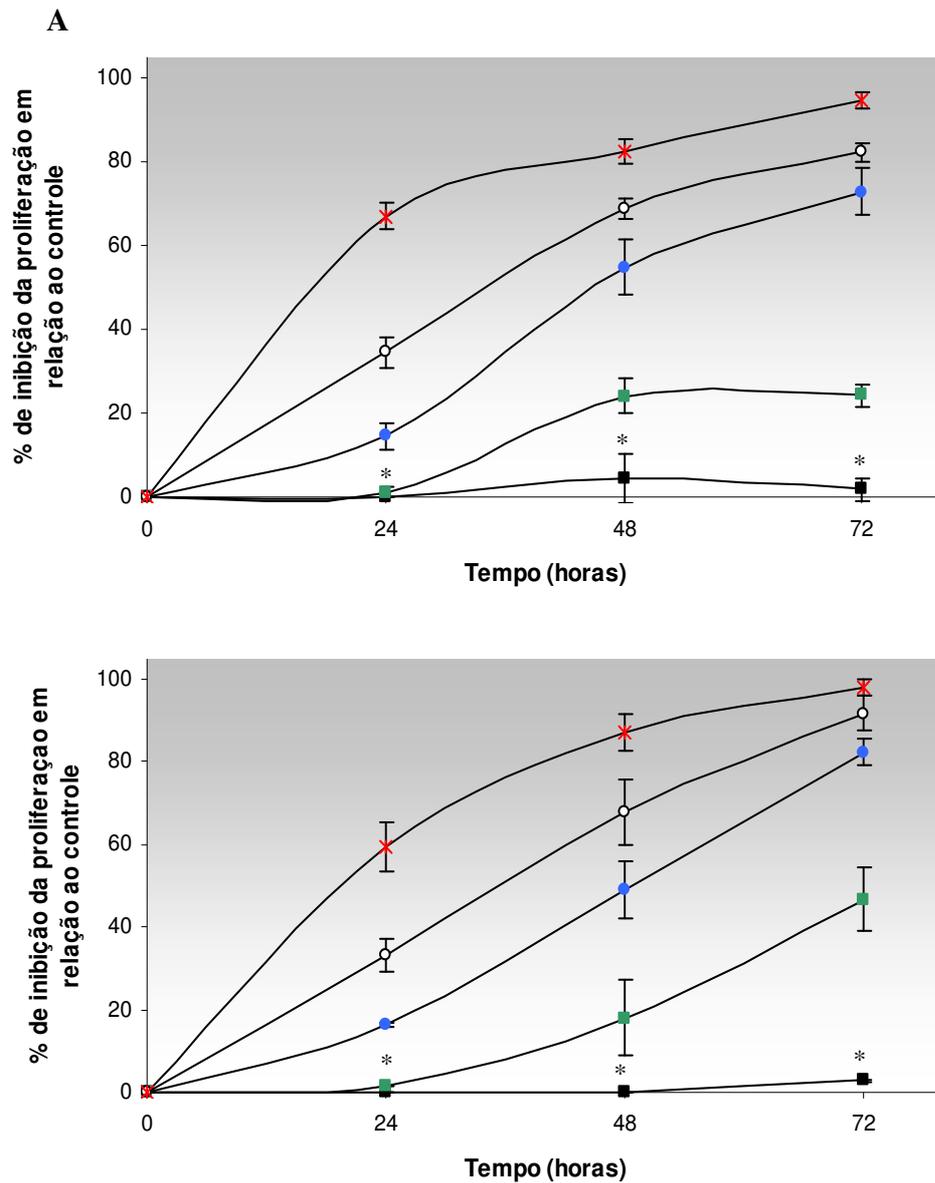


Figura 6. Efeito do Ibuprofeno na proliferação de *T. cruzi*. As células foram tratadas com diferentes concentrações de ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. (A) cepa Tulahuen 2 e (B) cepa Y, $100\mu\text{mol.L}^{-1}$ (■), $250\mu\text{mol.L}^{-1}$ (■), $500\mu\text{mol.L}^{-1}$ (●), 1mmol.L^{-1} (○) e 2mmol.L^{-1} (x). O número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. *Análise estatística:* (*) não significativamente diferente do controle ($p > 0,05$).

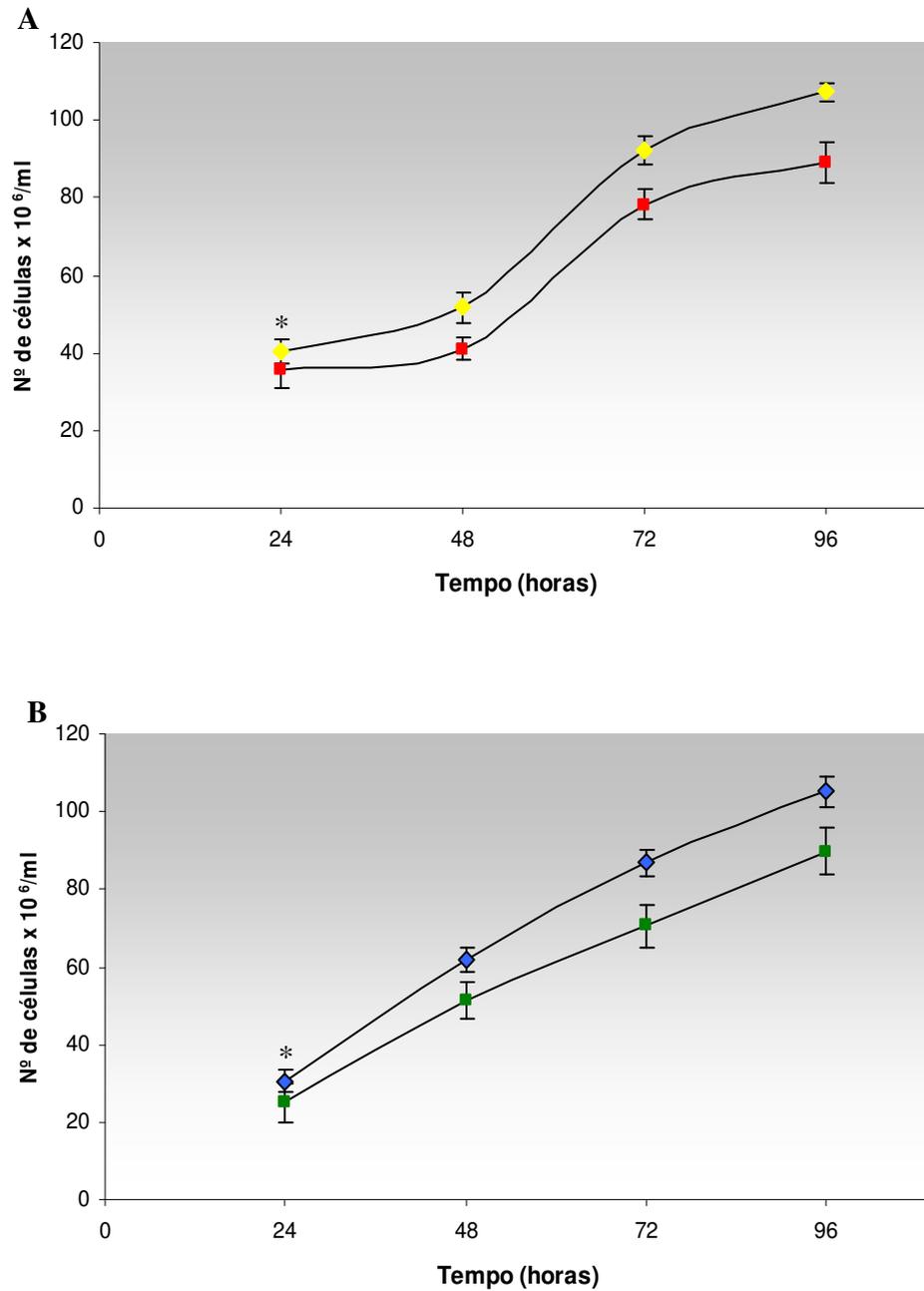


Figura 7. Proliferação do *T. cruzi* após tratamento com o fármaco. As células foram tratadas com $250\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ibuprofeno 48 horas. Após esse tempo, foi retirada a droga e analisada a proliferação em 24, 48, 72 e 96 horas, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. **(A)** ceapa Tulahuen 2 controle (■) e tratada (■); **(B)** ceapa Y, controle (■) e tratada (■). O número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. **Análise estatística:** (*) não significativamente diferente do controle ($p > 0,05$).

Analisando-se os dados foi possível verificar que, mesmo retirando a pressão da droga sobre os parasitas, as células não apresentaram um crescimento normal, exceto para o tempo de 24 horas.

6.2 Determinação da citotoxicidade do ibuprofeno

A avaliação da citotoxicidade do ibuprofeno sobre as células de *T. cruzi* pelo método do MTT, confirmam que a ação da droga é dose dependente. Este método de determinação de viabilidade celular se baseia na captação do MTT pelas células viáveis e sua redução ao composto formazan no interior das mesmas. Foi possível observar que quanto maior a dose de ibuprofeno à qual o parasita é exposto, maior é o efeito tóxico da droga para os mesmos. (Figura 8).

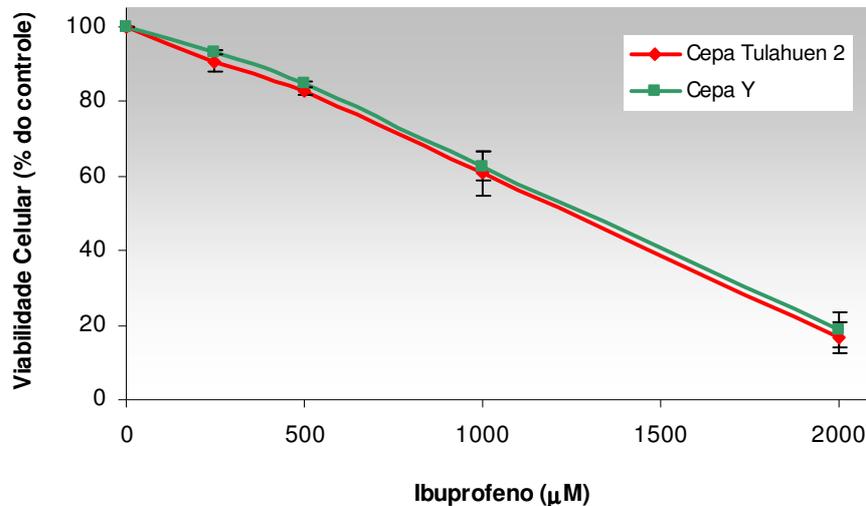


Figura 8. Efeito do ibuprofeno na viabilidade celular; as células foram tratadas por 24 horas com 250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ibuprofeno, e a viabilidade avaliada pelo método do MTT, como descrito em *Materiais e Métodos*. Os resultados foram expressos em porcentagem com relação ao controle. *Análise estatística:* Os resultados foram significativamente diferentes do controle e $p < 0,05$. Os resultados da cepa Y em relação à cepa Tulahuen 2 não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

A concentração de $250\mu\text{mol.L}^{-1}$ promoveu um efeito na citotoxicidade de cerca de 9% na cepa Tulahuen 2 e de cerca de 7% na cepa Y. A concentração de 2 mmol.L^{-1} promoveu a maior citotoxicidade para as duas cepas, sendo 81% para a cepa Y e 86% para a cepa Tulahuen 2, em 48 horas de tratamento.

Campos et al. (2004) apresenta em seu trabalho a efetividade dessa droga sobre células leucêmicas Walker 256, tratadas com $500\mu\text{mol.L}^{-1}$ da droga. Seus experimentos de viabilidade celular também demonstraram ser dependente do tempo de exposição das células à droga.

6.3 Consumo de oxigênio

Com a evidente efetividade do ibuprofeno sobre a proliferação e a viabilidade das células de *T. cruzi*, para ambas as cepas, resolvemos verificar se as funções mitocondriais do parasita eram mantidas mesmo após a exposição das células com diferentes tempos de incubação na concentração de $250\mu\text{mol.L}^{-1}$ da droga.

Observando-se os resultados obtidos com a respiração celular foi possível supor que a integridade da mitocôndria é mantida, pois o consumo de O_2 pelas células não teve alteração após o tratamento dos parasitas com $250\mu\text{mol.L}^{-1}$ da droga, independente do tempo de exposição (Figura 9).

As células de *T. cruzi* epimastigotas apresentam uma alta taxa respiratória em níveis basais (DOCAMPO et al, 1988). Algumas células, devido às diferenças na estrutura da mitocôndria podem apresentar diferenças significantes nos níveis de consumo de oxigênio (KOWALTOWSKI et al, 2001). Os resultados apresentados evidenciam que as cepas Tulahuen 2 e Y apresentam consumo de oxigênio em nível basal semelhantes, não apresentando diferenças significativas no consumo de O_2 entre ambas as cepas, mesmo levando-se em conta os diferentes tempos de avaliação.

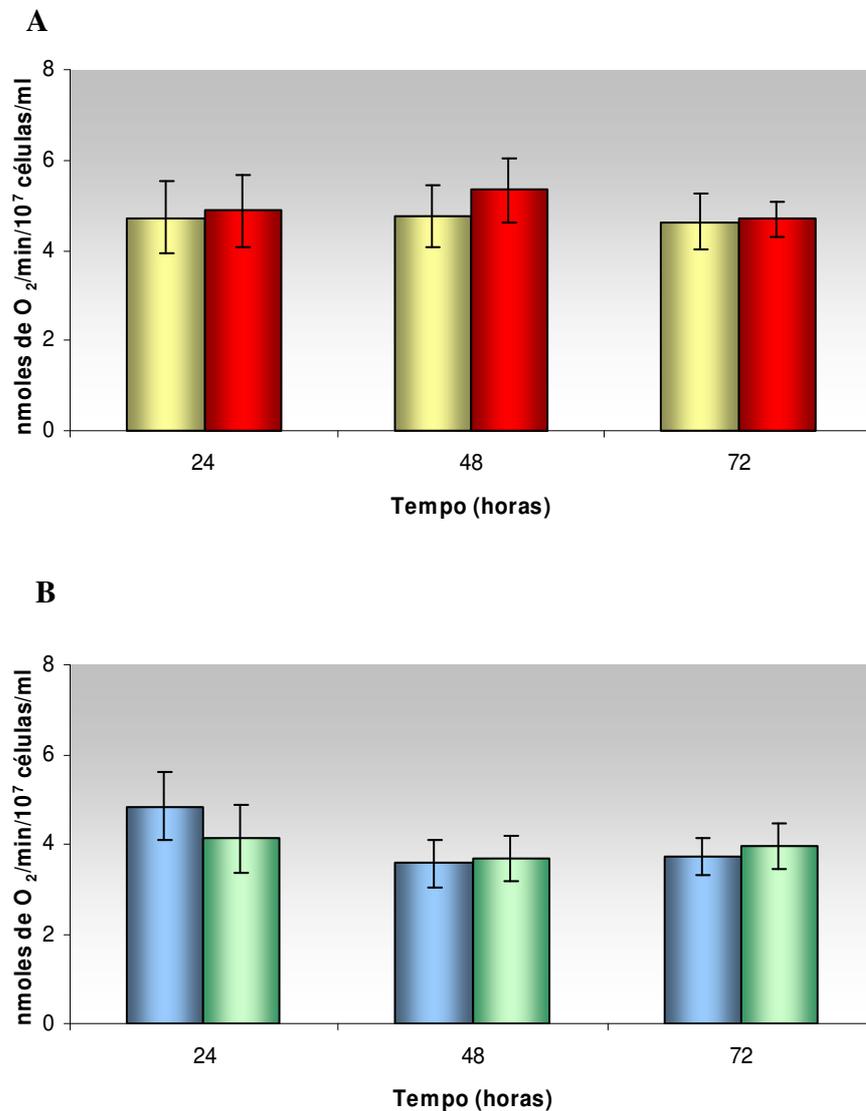


Figura 9. Consumo de oxigênio em células de *T. cruzi* (Respiração Celular). As células foram tratadas com 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas. A respiração celular foi avaliada em meio de respiração composto e os dados registrados por oxígrafo como descrito em *Materiais e Métodos*. (A) cepa Tulahuen 2, controle (■), e tratada (■). (B) cepa Y, controle (■) e tratada (■). *Análise estatística*: os grupos tratados com Ibuprofeno não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles ($p > 0,05$).

6.4 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A análise do potencial de membrana mitocondrial é um importante parâmetro para verificação da funcionalidade da mitocôndria e uma evidência indireta do status energético da célula (COSSARIZZA et al, 2001). Com base nessa informação, avaliamos a variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) para ambas as cepas.

Os experimentos de avaliação do potencial transmembrana mitocondrial demonstram que o ibuprofeno não possui a habilidade de promover alterações no mesmo, devido ao fato de este ser mantido mesmo após o tratamento das células com a droga. Para a análise do $\Delta\Psi_m$ foi utilizada a sonda DioC₆ (3), por citometria de fluxo em células não permeabilizadas (Figura 10).

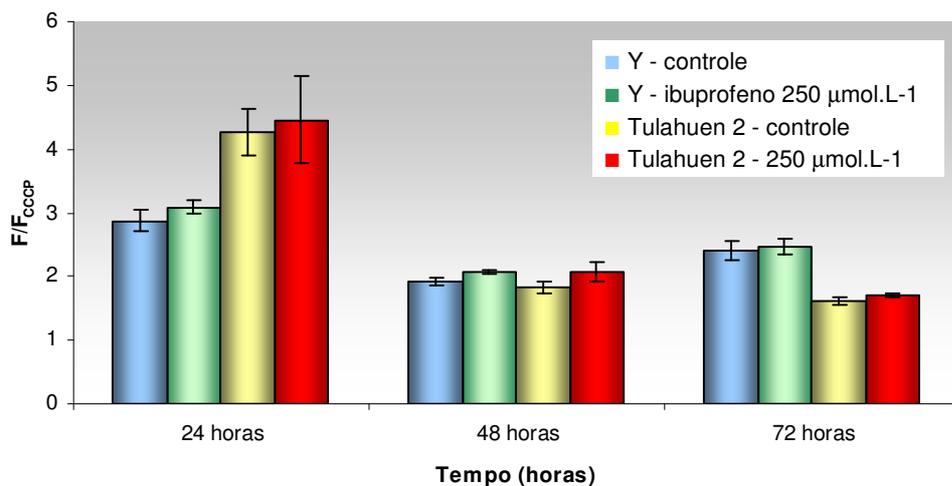


Figura 10. Determinação do potencial de membrana mitocondrial em células de *T. cruzi* tratadas com Ibuprofeno. As células foram tratadas com 250µmol.L⁻¹ de ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas, lavadas com PBS, marcadas com DioC₆(3) e posteriormente analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores foram expressos no resultado da razão entre F(ausência de CCCP) e F_{CCCP} (presença de CCCP). **Análise estatística:** Os resultados não foram significativamente diferente do controle ($p > 0,05$).

Foi possível observar que, para ambas as cepas, não houve alteração significativa do potencial transmembrana das células tratadas com ibuprofeno, visto que os valores permaneceram próximos aos potenciais transmembranas dos controles. A cepa Y

incubada durante 48 horas com ibuprofeno $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentou relação F/F_{CCCP} de 2,07, sendo o controle 1,92. A cepa Tulahuen 2 tratada por 72 horas com a mesma concentração do fármaco apresentou F/F_{CCCP} de 1,70, sendo o controle 1,62. Salienta-se, ainda, que no tempo de incubação de 24 horas, a relação F/F_{CCCP} do controle da cepa Tulahuen 2 foi superior à cepa Y, sugerindo uma maior atividade metabólica na fase lag para essa cepa.

Analisando-se o $\Delta\Psi_m$ em níveis basais (controles) das cepas nos diferentes tempos de tratamento, verifica-se que, com 24 horas de incubação, a cepa Tulahuen 2 apresentou potencial transmembrânico maior que a cepa Y. Já com 48 horas, o potencial foi semelhante para ambas as cepas. Todavia, no tempo de 72 horas, o potencial para a cepa Y foi maior que o da cepa Tulahuen 2 (Figura 12). Tal fato se explica, possivelmente, pelas diferenças ao longo das curvas de crescimento das duas cepas (MIELNICZKI-PEREIRA et al, 2006).

Portanto, é possível demonstrar que, sob as condições experimentais apresentadas, o mecanismo de morte celular induzido pelo ibuprofeno em células de *T. cruzi* não causa alterações significativas nas funções mitocondriais, visto que a respiração e o potencial de membrana mitocondrial nas células não sofreram alterações significativas. Podemos, assim, afirmar que os mecanismos de morte são ativados por outras vias que não a mitocondrial, pois os dados demonstraram que a integridade da mitocôndria é mantida.

Em seu trabalho, Campos et al. (2004) demonstram que o mecanismo que leva as células leucêmicas Walker 256 à morte não é precedido pela perda progressiva do $\Delta\Psi_m$. Essas evidências também foram verificadas em diversas células carcinogênicas, como células de próstata humanas das linhagens PC3 e DU-145 (THURNHER et al, 2001) e células de carcinomas prostáticos (ANDREWS et al, 2002; JOHNSON et al, 2002).

Ainda em sua pesquisa, Campos et al (2004) conclui que o ibuprofeno sozinho não é capaz de afetar as funções mitocondriais em células permeabilizadas bem como em células não-permeabilizadas e que o potencial de membrana mitocondrial é mantido pela respiração e não pela hidrólise de ATP via ATP sintase.

6.5 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio

Diversos trabalhos mostram a capacidade do ibuprofeno em aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio no interior das células, dos mais diversos tipos celulares (KUSUHARA et al, 1999, MCKEEVER et al, 2005).

A fim de investigar se o tratamento das células com o ibuprofeno poderia levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células de *T. cruzi*, e se esta geração ocorre em quantidades significativas, os níveis destes radicais foram avaliados antes e após o tratamento das células com a droga. Para a avaliação dos níveis de EROs utilizou-se dihydroethidium (DHE), uma sonda que se complexa com radicais superóxidos produzidos na célula.

Observando-se os dados da determinação da produção de EROs (Figura 11), foi possível verificar que a produção desses radicais no interior das células é aumentada significativamente, sendo essa mais pronunciada na cepa Y.

Nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas foi possível observar um aumento na geração de ERO's na cepa Y de 2,6 e 2,7 vezes em relação ao controle, respectivamente. Em contrapartida, na cepa Tulahuen 2 este aumento é de 2 vezes em relação ao controle para os tempos de 24 e 48 horas de tratamento.

No tempo de 72 horas de tratamento o aumento na geração de EROs na cepa Tulahuen 2 foi de aproximadamente 2,6 vezes em relação ao controle. Já na cepa Y esse aumento foi de aproximadamente 2,5 vezes em relação ao controle.

Em níveis basais (controle) foi possível verificar que a quantidade de radicais presentes na cepa Tulahuen 2 era menor que na cepa Y. Esses resultados estão de acordo com os publicados anteriormente com relação a essas cepas, onde a cepa Tulahuen 2 apresenta maior resistência ao estresse oxidativo em relação à cepa Y (MIELNICZKI-PEREIRA et al, 2006).

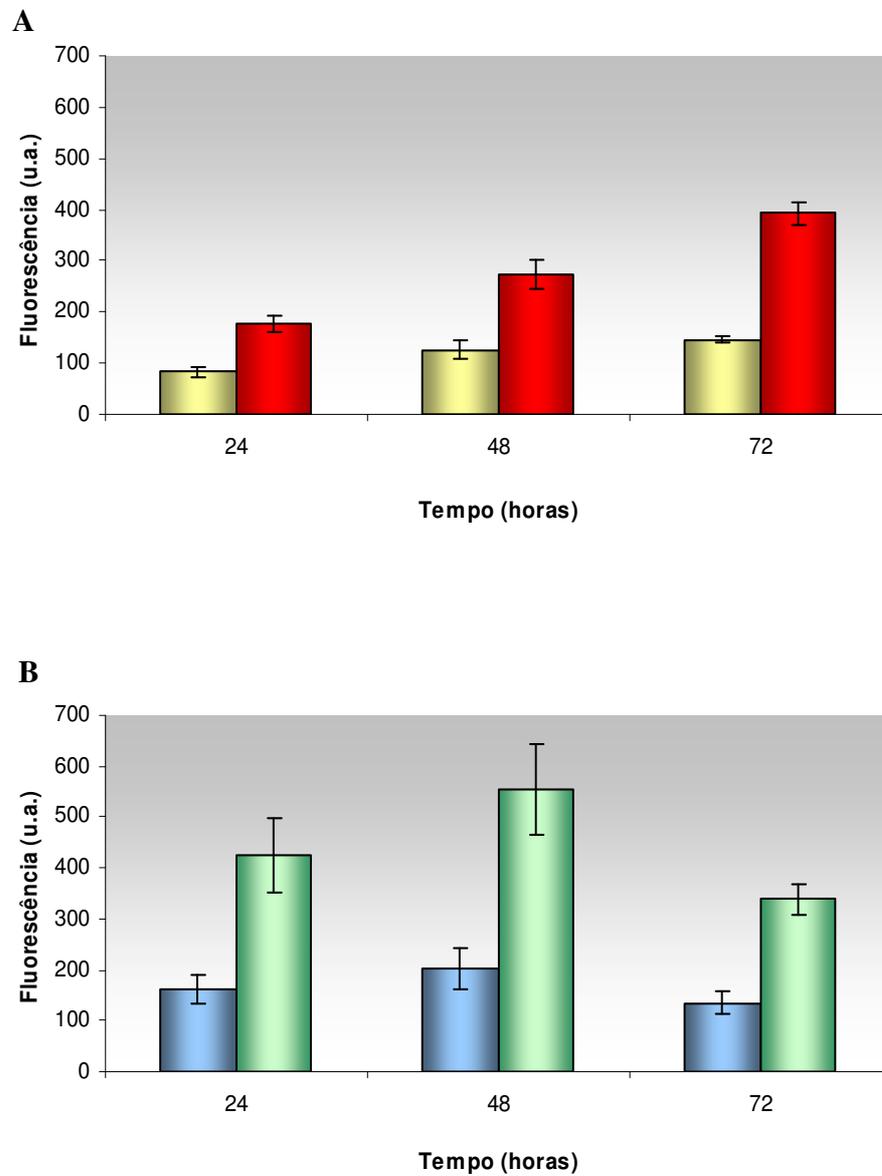


Figura 11. Produção de EROs em células de *T. cruzi*. (A) cepa Tulahuen 2, controle (■), e tratada (■). (B) cepa Y, controle (■) e tratada (■). 1×10^6 células/ml foram tratadas com $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas, lavadas em PBS incubadas com $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de dihidroetidium (DHE) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em *Materiais e Métodos*. **Análise estatística:** os grupos tratados com Ibuprofeno apresentaram diferenças significativas em relação aos controles ($p < 0,05$).

6.6 Atividade das enzimas G6PD e 6PGD

A via das pentoses fosfato é uma via secundária de utilização de glicose em grande parte dos organismos e tem sido estudada, freqüentemente, devido ao seu fundamental papel na redução de NADP^+ à NADPH , necessário em reações de biossíntese e também na proteção das células contra o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio. Nesta via, as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) são as duas enzimas responsáveis pela redução do NADP^+ ao NADPH (MAUGERI et al, 2004). Desempenham papéis fundamentais na redução da TSH, como discutido na página 26.

Com o objetivo de investigar uma correlação entre a atividade das enzimas G6PD e 6PGD e o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, as atividades destas enzimas foram determinadas antes e após o tratamento das células com o ibuprofeno.

No primeiro dia de tratamento das células de *T. cruzi* com a droga, não houve diferença significativa entre a atividade da enzima G6PD das células tratadas e das células não tratadas (controle) para ambas as cepas. O mesmo ocorreu com a enzima 6PGD (Figura 12).

Após 48 horas de tratamento das células com o ibuprofeno observa-se uma elevação na atividade da enzima G6PD para ambas as cepas Y e Tulahuen 2 ($0,63 \pm 0,06$ e $0,99 \pm 0,06$ $\mu\text{moles NADPH produzido/min}/10^6$ células, respectivamente), sendo possível verificar que este aumento foi mais pronunciado na cepa Tulahuen 2. A atividade da enzima 6PGD manteve-se constante para nas duas cepas.

A elevação da atividade da enzima G6PD foi ainda mais significativa após tratamento de 72 horas com a droga, sendo de $0,91 \pm 0,11$ $\mu\text{moles NADPH produzido/min}/10^6$ células para a cepa Y e de $1,32 \pm 0,1$ $\mu\text{moles NADPH produzido/min}/10^6$ células para a cepa Tulahuen 2. Novamente evidenciou o aumento mais significativo na cepa Tulahuen 2 em relação à cepa Y. Como ocorrido anteriormente, a atividade da enzima 6PGD se manteve constante nas duas cepas.

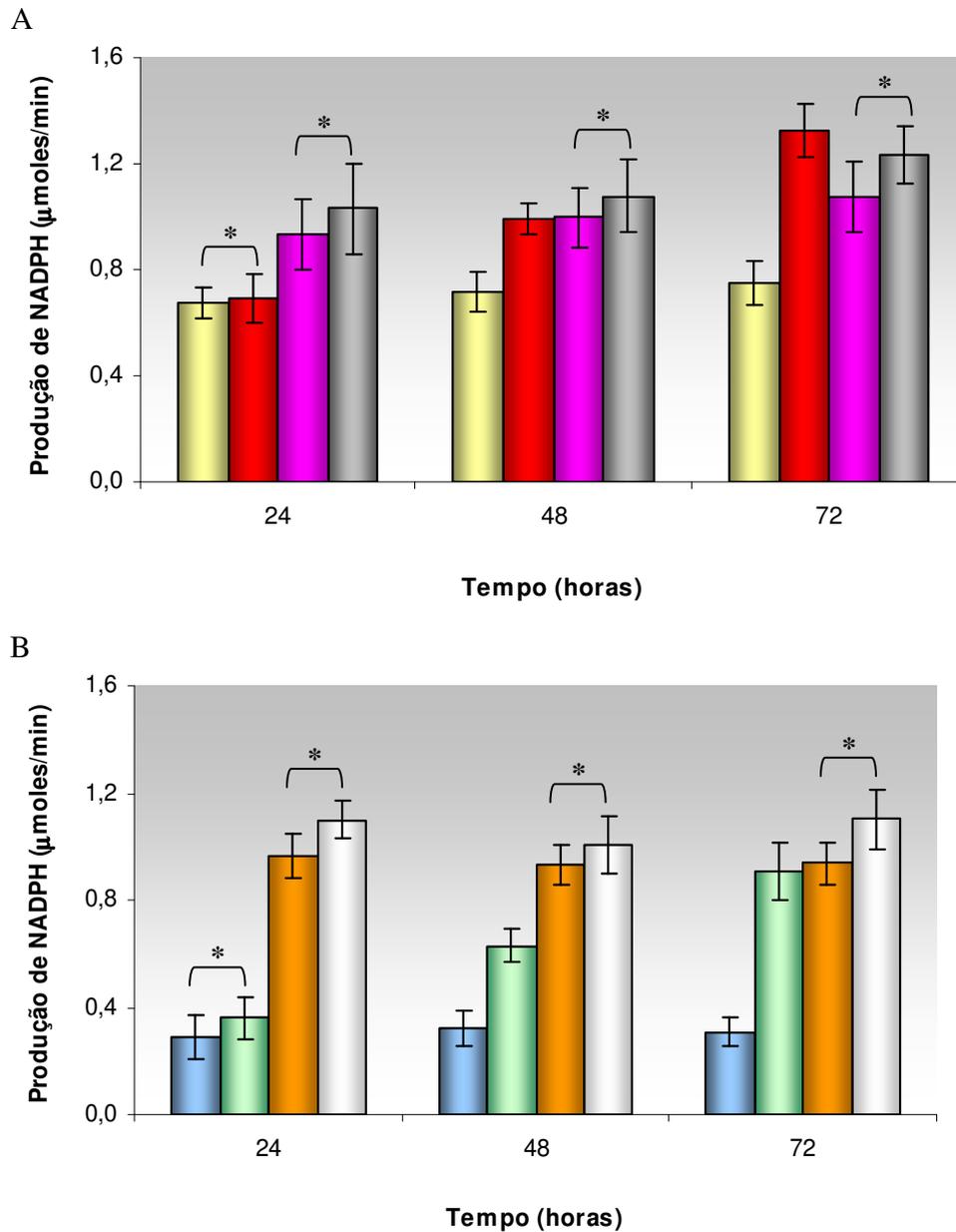


Figura 12. Atividade das enzimas G6PD e 6PGD em células de *T. cruzi* tratadas com ibuprofeno. (A) cepa Tulahuen 2, G6PD controle (■), G6PD das células tratadas (■), 6PGD controle (■) e 6PGD das células tratadas (■). (B) cepa Y, G6PD controle (■), G6PD das células tratadas (■), 6PGD controle (■) e 6PGD das células tratadas (■). 1×10^6 células/ml foram tratadas com $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas, lavadas em PBS e a cinética enzimática das enzimas G6PD e 6PGD medidas como descrito em *Materiais e Métodos*. **Análise estatística: (*) Não significativamente diferente do controle ($p > 0,05$).**

Os resultados evidenciaram que as cepas Y e Tulahuen 2 apresentam diferença na atividade da enzima G6PD em níveis basais (controle). A atividade desta enzima é consideravelmente maior na cepa Tulahuen 2, como demonstrado na Figura 12. Mielniczki-Pereira et al (2006) descreve em seu trabalho a diferença na atividade da enzima G6PD entre as duas cepas, o que possivelmente explica a maior resistência da cepa Tulahuen 2 ao estresse oxidativo. Outro fato mostrado em seu trabalho é que a cepa Tulahuen 2 apresenta maior índice de proliferação em relação à cepa Y, o que nos permite inferir que a enzima G6PD é importante para a proliferação do *T. cruzi*, assim como ocorre em outros tipos de células eucarióticas (TIAN et al, 1998; SALVEMINI et al, 1999; HO et al, 2000).

Estas variações nos padrões da atividade da enzima estudada nas duas cepas podem ser reflexo de variações intra-específicas em parâmetros cinéticos, como Km e Vmáx. Variações desta ordem já foram observadas em diversos tripanossomatídeos. Lupiañez e colaboradores (1987) demonstraram que, em formas metacíclicas de *T. cruzi*, o Km da enzima G6PD para a glicose-6-fosfato é 4,6 vezes mais alto que nas formas epimastigotas (1,06 m molL⁻¹ contra 0,23 mmol.L⁻¹; respectivamente).

O papel da G6PD na defesa contra o estresse oxidativo é bem conhecido em eritrócitos humanos – a queda da atividade desta enzima acarreta em sérias anemias hemolíticas. Esta enzima é a enzima chave na regulação da via das pentoses e sua atividade depende fundamentalmente da razão NADP/NADPH. Nos processos de defesa celular ao estresse oxidativo, em que a utilização de NADPH é alta, ocorre em uma drástica queda nesta razão, levando, conseqüentemente, à ativação desta enzima. Em resposta ao estresse oxidativo também há um aumento nos níveis de expressão da enzima, fato que não ocorre com a enzima 6PGD (IGOILLO-ESTEVE et al, 2006).

6.7 Tióis Totais

Os tióis são descritos como os principais responsáveis pelos efeitos antioxidantes das proteínas. Além disso, alguns estudos, como feito por Krieger et al (2000), mostram uma correlação entre os níveis de tióis livres na célula e os níveis de radicais livres. Quando estes estão aumentados no interior das células reagem com os grupos tióis livres das proteínas, o que acarreta em uma diminuição no número destes grupos livres nas células.

Como pode ser observado na Figura 13, o tratamento com o ibuprofeno não apresentou alteração significativa dos níveis de tióis totais, sugerindo que a produção de radicais livres induzida pelo ibuprofeno pode não ser suficiente para promover a oxidação de macromoléculas.

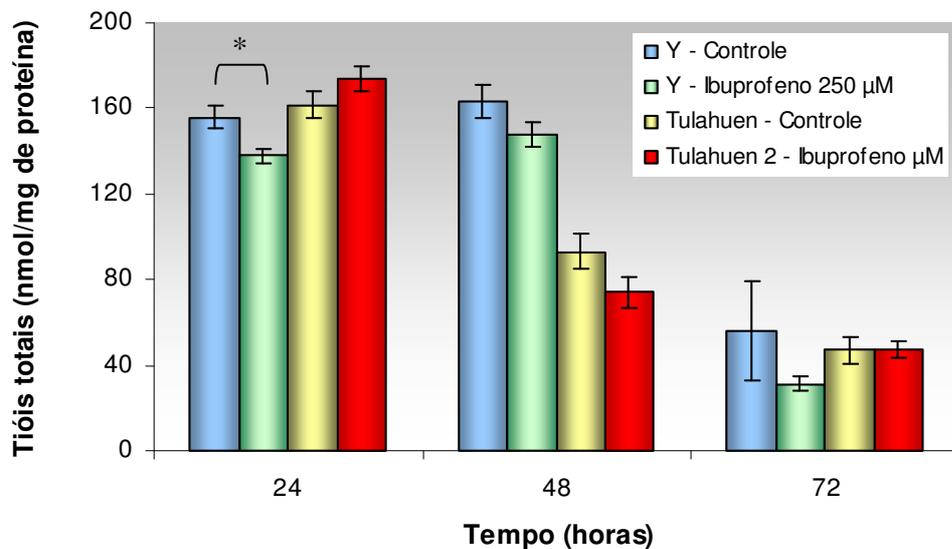


Fig. 13. Determinação de tióis totais em células de *T. cruzi* tratadas com Ibuprofeno; as células foram tratadas com 250 µmol.L⁻¹ de ibuprofeno por 24, 48 e 72 horas. A concentração de tióis totais então determinada. Os resultados expressos em nmol de tióis por mg de proteínas. Cepa Y, controle (■), e tratada (■). Cepa Tulahuen 2, controle (■) e tratada (■). *Análise estatística:* (*) $p > 0,05$.

Através da análise dos resultados, observa-se que não houve diferença significativa nos níveis de tióis totais das células tratadas com $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em relação ao controle em ambas as cepas nos diferentes tempos de incubação, exceto para o tempo de 24 horas para a cepa Y. Deste modo, sugere-se que as EROs geradas em função do tratamento com o fármaco não geram radicais livres em níveis suficientes para promover a oxidação de proteínas.

Como descrito por diversos autores (THURNHER et al, 2001; ANDREWS et al, 2002; JOHNSON et al, 2002; CAMPOS et al, 2004 entre outros), a droga utilizada mostrou ser capaz de aumentar significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio, os quais podem acarretar danos irreparáveis às células bem como ativar diversas vias de morte celular.

Por outro lado, o ibuprofeno não apresentou a capacidade de alterar as funções mitocondriais nas duas cepas, visto que o consumo de oxigênio por elas se manteve normal após o tratamento. Tal fato pode ser confirmado quando avaliamos a variação no potencial de membrana, já que este é um parâmetro fundamental na verificação da funcionalidade mitocondrial.

Diante dos resultados encontrados, acredita-se que o principal mecanismo de morte celular de *T. cruzi* está diretamente ligado à capacidade do ibuprofeno de aumentar os níveis de radicais livres nas células. Com estudos mais aprofundados, talvez seja possível comprovar uma eficácia mais significativa dessa droga e encontrar uma nova opção para o tratamento da doença de Chagas.

7. Conclusão

Diante dos resultados obtidos, com os experimentos de consumo de O₂ e potencial de membrana mitocondrial, pode-se verificar que o tratamento com ibuprofeno não foi capaz de alterar as funções mitocondriais das células de *T. cruzi*, pois os mesmos eram mantidos mesmo após o tratamento das células do parasita com a droga.

Por outro lado, a droga mostrou-se tóxica para as células das duas cepas, como visto nos dados de proliferação e citotoxicidade celular, sendo eficiente em impedir sua proliferação em meio de cultura. E que os mesmos são tempo e dose dependente, ou seja, quanto maior o tempo e a concentração de exposição do parasita à droga, maiores os impactos sobre a proliferação das mesmas. Além disso, mesmo depois de retirarmos a droga do meio onde estavam as células, elas não apresentavam mais nível de proliferação normal.

O ibuprofeno também se mostrou capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio. Como as células de *T. cruzi* são altamente susceptíveis a estes radicais, o aumento destes poderia ser o fator desencadeador de sua morte.

O aumento na produção de EROs pode ser confirmado pelos dados obtidos com as medidas das atividades das enzimas G6PD e 6PGD, visto que em ambas as cepas esta atividade se apresenta aumentada, sinalizando que a formação destes radicais são suficientes para ativar vias responsáveis pela eliminação dos mesmos destas células. Entretanto, os níveis dos radicais gerados não é capaz de afetar estruturas protéicas, como podemos verificar com a análise de tióis totais nas células.

Diante desses resultados promissores contra o *T. cruzi*, o mecanismo de indução da morte induzida pela droga deve ser investigado em maiores detalhes para talvez futuramente vir a transformar-se em uma nova alternativa para o tratamento da doença de Chagas.

Referências Bibliográficas

ANDREWS, J. et al. Superior effectiveness of ibuprofen compared with other NSAIDs for reducing the survival of human prostate cancer cells. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. Washington, v. 50, n. 4, p. 277-284. 2002.

ARGOLO, A.M. et al. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/media/Livro%20Chagas.pdf>>. Acesso em 08 nov. 2007.

BANKI, K. et al. Elevation of Mitochondrial Transmembrane Potential and Reactive Oxygen Intermediate Levels Are Early Events and Occur Independently from Activation of Caspases in Fas Signaling. **The Journal of Immunology**. Syracuse, v. 162, n. 3, p. 1466-1479. 1999.

BARRADAS, A. et al. **A Doença de Chagas**. 2002. Disponível em: <http://www.ualg.pt/npfcma/docs/trab_bmp/pat_mon_chagas.pdf>. Acesso em: 01 mai. 2007.

BASTIEN, J. **The Kisses of Death: Chagas Disease in the Americas**. 1998. Disponível em: <<http://www.uta.edu/chagas/>>. Acesso: 21 fev. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional De Saúde. **Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil**. Brasília, 2002, 43p.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN). **Doença de Chagas Aguda: Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN**, 2004, Brasília.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. **Controle da Doença de Chagas**, 2004, Brasília.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. In: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, supl. III, 29p., 2005.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Infectologia. **Brasil elimina transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans***. 2006. Disponível em: <http://www.sbinfecto.org.br/default.asp?site_Acao=MostraPagina&paginaId=134&mNoti_Acao=mostraNoticia¬iciald=134>. Acesso em: 06 nov. 2007.

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

BURCHMORE, R. J. S. et al. Chemotherapy of human African Trypanosomiasis. **Benthan Current Pharmaceutical Design**, Glasgow, v. 8, n. 4, p. 257-267. 2002.

CAMARGO, E. Growth and differentiation in *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 6, n. 6, p. 90-100, nov./dez. 1964.

CAMPOS, C.B.L. et al. Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. **Biochemical Pharmacology**, Campinas, v. 68, n.11, p. 2197-2206, nov./dez. 2004.

CARNIERI, E.G.S.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. Trypanothione – dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Urbana, v. 61, n.1, p. 79-86, set. 1993.

COSSARIZZA, A.; SALVIOLI, S. Analysis of Mitochondrial Membrane Potential with the Sensitive Fluorescent Probe JC-1. **Purdue Cytometry. Modena**, v. 4, n. 1, p. 256-261. 2001.

COSTA, D. et al. Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. Porto, v. 29, n. 8, p. 1659-1670. 2006.

COURA, J.R.; CANÇADO, J.R. **A história da terapêutica da doença de Chagas**. 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124>>. Acesso em: 06 nov. 2007.

DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. **A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas**. 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124>>. Acesso em: 03 dez. 2007.

- DE SOUZA, W.; SOUTO-PADRÓN, T. The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae. **The Journal of Parasitology**. Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 229-235. 1980.
- DEGASPERI, G.R. et al. Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca²⁺. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Campinas, v. 38, n.1, p. 1-10, jan./fev. 2006.
- DENISE, H.; BARRET, M. P. Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. **Biochemical Pharmacology**, Escócia, v. 61, n.1, p. 1-5, jan. 2001.
- DEVERA, R. et al. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. 323-330, jul./ago. 2002.
- DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, sup. 1, p. 13-22, 2007.
- DIAS, J. C. P. **Epidemiology of Chagas disease**.1992. Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html>>. Acesso em: 17 mar. 2005.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas – uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de janeiro: Ed. Fiocruz, 1997.
- DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, n. 4, p. 373-383, jul./ago. 1998.
- DOCAMPO, R.; VERCESI, A. E. Ca²⁺ Transport by coupled *Trypanosoma cruzi* Mitochondria *in situ*. **The Journal of Biological Chemistry**. Campinas, v. 264, n. 1, p. 108-111. 1988.
- DVORAK, J. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. **Molecular Biochemistry and Parasitology**, Bethesda, v. 31, n.1, p. 19-26, set./out. 1988.
- FINZI, J.K. et al **Estudo da superexpressão da triparedoxina peroxidase em *Trypanosoma cruzi* epimastigotas**. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FRANK, J. E. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. **American Family Physician**. Georgia, v. 72, n. 7, p. 1277-1282. 2005.

GALVÃO, C. A. Sistemática dos triatomíneos (hemiptera, reduviidae), de DE GEER ao DNA. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 511-530, out./dez. 2003.

GOIJMAN, S.G.; STOPPANI, A.O. Effects of nifurtimox, benznidazole, and beta-lapachone on the metabolism of DNA, RNA and proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 15, n. 4, p. 193-204, 1983.

GONTIJO, E.D.; SANTOS, S. E. **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas**. 2007. Disponível em:
<<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>>. Acesso em: 05 nov. 2007.

GREIG, N. et al. Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry Journal**. Dundee, v. 400, n. 2, p. 217-223. 2006.

HO, H. Y. et al. Enhanced oxidative stress and accelerated cellular senescence in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient human fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**. Taipei, v. 29, n. 2, p. 156-169. 2000.

IGOILLO-ESTEVE, M.; CAZZULO, J. J. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. **Molecular Biochemistry Parasitology**. Buenos Aires, v. 149, n. 2, p. 170-181. 2006.

IMTEV. **Instituto do Milênio de Desenvolvimento e Tecnologia de Vacinas**. 2008. Disponível em: <<http://www.cpqrr.fiocruz.br/imtev/BR/>> Acesso em 05/05/2008.

ISHII, N. Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer. **Cornea**. Isehara, v. 26, n. 9, p. 3-9. 2007.

JAKUBIKOVÁ, J. et al. Non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen-induced apoptosis, cell necrosis and cell cycle alterations in human leukemic cells in vitro. **Neoplasma**. República Eslováquia, v. 48, n. 3, p. 208-213. 2001.

JO, S. H. et al. Control of Mitochondrial Redox Balance and Cellular Defense against Oxidative Damage by Mitochondrial NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase (IDPm). **The Journal of Biological Chemistry**. Taegu, v. 276, n. 19, p. 16168-16176. 2001.

JOHNSON, A. J. et al. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. **The Biochemical Journal**. Kentucky, v. 366, n. 3, p. 831-837. 2002.

KAUSHAL, M.; KUTTY, N. G.; RAO, C. M. Nitrooxyethylation reverses the healing-suppressant effect of Ibuprofen. **Mediators of Inflammation**. New Delhi, v. 2006, n. 4, p. 26-30. 2006.

KELLY, J. et al. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which overexpress trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. **Eur. J. Biochem.**, Londres, v. 218, n.1, p. 29-37, nov. 1993.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 2006/2007 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KOWALTOWSKI, A. J; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**. São Paulo, v. 495, n. 1-2, p. 12-15. 2001.

KRIEGER, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, Heidelberg, v. 35, n. 3, p. 542-552, jan./fev. 2000.

KUSUHARA, H. et al. Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured gastric cells. **European Journal of Pharmacology**. Osaka, v. 383, n. 3, p. 331-337. 1999.

MAUGERI, D. A.; CAZZULO, J.J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**. Buenos Aires, v. 234, n.1, p. 117-123. 2004.

MAYA J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurant derivatives. **Biochemical Pharmacology**, Chile, v. 65, n. 6, p. 999-1006, mar. 2003.

MCKEEVER, T. M. et al. The association of acetaminophen, aspirin, and ibuprofen with respiratory disease and lung function. **American Journal of Respiratory and critical care medicine**. Nottingham, v. 171, n. 9, p. 966-971. 2005.

MIELNICZKI-PEREIRA, A.A. et al. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. **Acta Tropica**, Campinas, v. 101, n.1, p. 64-60, nov./dez. 2006.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. In: **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n. 5, p. 577-591, Julho, 2003.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMES-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, Madrid, v. 86, n.12, p. 999-1002, dez. 2000.

MURTA, S. M. F. et al. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular Biochemistry and Parasitology**, Belo Horizonte, v. 93, n. 2, p. 203-214, mai./jun. 1998.

NEWA, M. et al. Enhancement of Solubility, Dissolution and Bioavailability of Ibuprofen in Solid Dispersion Systems. **Chemical Pharm. Bull.** Nanjing, v. 56, n. 4, p. 569-574. 2008.

PALAYOOR, S.T. et al. Combined antitumor effect of radiation and ibuprofen in human prostate carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**. Boston, v. 4, n. 3, p. 763-771. 1998.

PERL, A. et al. Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. **PNAS**. Ithaca, v. 103. n. 40, p. 14813-14818. 2006.

PRATHALINGHAM, S.R. et al. Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodB1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Londres, v. 51, n. 2, p. 755-758, dez, 2008.

REPETTO, Y. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. **Biochemistry & Molecular Biology**. Santiago, v. 116, n. 2, p. 281-285, set./out. 1996.

REPETTO, Y et al. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. **Biochemistry and Molecular Biology**. Santiago, v. 115, n. 2, p. 281-285, 1996.

SALVEMINI, F. et al. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. **Journal of Biological Chemistry**. Nápoli, v. 274, n. 5. p. 2750-2757. 1999.

SALVIOLI, S. et al. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. **FEBS Letters**. Modena, v. 411, n.1, p. 77-82. 1997.

SILVA, R.A.; CARVALHO, M.E.; RODRIGUES, V.L.C.C. **Doença de Chagas**. 2001.
Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/chagas/texto_chagas_pro.htm#def>
Acesso: 16 jul 2007.

SILVEIRA, J. F. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 127-152.

SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**. Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 269-285. 2002.

SWETHA V.P.; BASU A.; PHALE P.S. Purification and Characterization of 1- Naphthol-2-Hydroxylase from Carbaryl-Degrading Pseudomonas Strain C4. **Journal of Bacteriology**, Powai, v. 189, n.7, p. 2660-2666, mar./abr. 2007.

TANG, D. G.; CHEN, Y. Q.; HONN, K. V. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Detroit, v. 93, n. 11, p. 5241-5246. 1996.

TANG, D. G.; HONN, K. V. Apoptosis of W256 carcinosarcoma cells of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: Role of 12-lipoxygenase in regulating tumor cell survival. **Journal of Cellular Physiology**. Detroit, v. 172, n. 2, p. 155-170. 1997.

THURNHER, D. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in head and neck cancer cell lines. **Acta oto-laryngologica**. Vienna, v. 121, n. 8, p. 957-962. 2001.

TIAN, W. N. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. **Journal of Biological Chemistry**. Boston, v. 273, n. 17, p. 10609-10617. 1998.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**. Caracas, v. 8, n. 4, p. 287-295. 2002.

VERCESI, A.E et al. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. **Journal of Biological Chemistry**, Campinas, v. 266, n. 22, p. 14431-14434, ago. 1991.

VERÇOSA, A. F. A. **Caracterização do Perfil Isotópico das Imunoglobulinas G de Indivíduos Chagásicos Frente aos Antígenos Recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

VIODÉ, C. et al. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochemical. Pharmacology**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 549-557, mar./abr. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease: multi-governmental strategies**. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Life-cycle of *Trypanosoma cruzi***. 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2007.

YOUNG, C. et al. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, Providence, v. 47, n. 3, p. 540-544, mar. 2007.

ZECCHIN, K.G. et al. High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H₂O₂-induced apoptosis via calcineurin pathways. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Campinas, v. 39, n. 2, p. 186-194, mar./abr. 2007.

ZINGALES, B. **Métodos bioquímicos e moleculares**. 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=12>> Acesso em: 03 dez. 2007.

ANEXOS

ANEXO I: COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose)

NaCl 4mg/ml; KCl 0,4mg/ml; Glicose 2mg/ml; KH_2PO_4 8mg/ml; Tryptose 5mg/ml; Hemina 0,02mg/ml; pH ajustado para 7,4.

Tampão Fosfato Salino (PBS)

NaCl 8mg/ml ; KCl 0,2mg/ml ; Na_2HPO_4 1,44mg/ml e KH_2PO_4 0,2mg/ml em água ultra pura; pH ajustado para 7,4.

Meio de Ensaio enzimático²

Tris-HCl (50mmol.L^{-1}) pH 7,6; KCl (50mmol.L^{-1}); 0,1% de Triton X-100 e MgCl_2 (2mmol.L^{-1}) em água ultra pura; pH ajustado para 7,4.

Meio de Respiração

Sacarose 125mmol.L^{-1} ; KCl 65mmol.L^{-1} ; HEPES 10mmol.L^{-1} ; KH_2PO_4 2mmol.L^{-1} ; Mg^{2+} $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ em água ultra pura; pH ajustado para 7,4.

² Meio usado nos experimentos de atividade das enzimas G6PD e 6PGD.