



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E  
ENFERMAGEM  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CLARISSA PERDIGÃO MELLO**

**ESTUDO *in vitro* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA  
BATROXICIDINA- CATELICIDINA DA GLÂNDULA DE VENENO  
DA SERPENTE *Bothrops atrox*.**

**Fortaleza  
2017**

**CLARISSA PERDIGÃO MELLO**

**ESTUDO *in vitro* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA  
BATROXICIDINA- CATELICIDINA DA GLÂNDULA DE VENENO  
DA SERPENTE *Bothrops atrox*.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de Concentração:** Farmácia

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alice Maria Costa Martins

**Co-Orientador:** Prof<sup>º</sup>.Dr. Gandhi Rádis Baptista

**Fortaleza**  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M477e Mello, Clarissa Perdigão.  
ESTUDO in vitro DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA BATROXICIDINA- CATELICIDINA DA  
GLÂNDULA DE VENENO DA SERPENTE *Bothrops atrox*. / Clarissa Perdigão Mello. – 2017.  
114 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e  
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.  
Coorientação: Profa. Dra. Gandhi Rádis Baptista.

1. Batroxicidina . 2. Trypanosoma cruzi. 3. Doença de Chagas.. I. Título.

CDD 615

---

**CLARISSA PERDIGÃO MELLO**

**ESTUDO *in vitro* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA  
BATROXICIDINA- CATELICIDINA DA GLÂNDULA DE VENENO  
DA SERPENTE *Bothrops atrox*.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria de Fátima Oliveira  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Claudio Borges Falcão  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ticiano Praciano Pereira  
Faculdade Metropolitana de Fortaleza-FAMETRO

À minha família, meu porto seguro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, nos momentos difíceis, dando força e coragem para superar os obstáculos. E nos momentos de alegria, me mostrando o quanto sou abençoada por ele e por sua mãe Maria.

Ao meu filho, Miguel, que em tão pouco tempo, foi capaz de me ensinar mais do que aprendi durante toda minha vida, e me deu meu maior título, “MÃE”.

Ao meu pai, Jorge, por todos os ensinamentos, amor e carinho dedicados em vida.

À minha mãe, Liana, minha melhor amiga, pelo amor incondicional, apoio, educação, exemplo, confiança e incentivo durante minha vida.

Ao meu marido, Daniel, por ser um companheiro extremamente dedicado, atencioso e paciente, que torce e se orgulha pelo meu sucesso acima de tudo.

Aos meus sogros, Marcondes e Tânia, pelo constante incentivo e por compreenderem muitas vezes minha ausência.

À minha cunhada, Camila, por me apoiar e me ajudar todas as vezes que precisei e pelos 20 anos de uma amizade tão verdadeira.

À minha família, meus tios e primos, por toda a alegria e apoio que trazem a minha vida, sendo fundamentais para a realização dos meus sonhos. Muito obrigada por sempre acreditarem e torcerem por mim!

À professora Dra. Alice Costa Martins, pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação, apoio e pelos valiosos ensinamentos durante todos esses anos.

Ao professor Dr. Gandhi, que confiou e acreditou em mim para desenvolver a pesquisa com o peptídeo isolado por seu grupo de pesquisa, ajudando e participando de todas as etapas no desenvolvimento desse trabalho.

À amiga Ticiano Praciano, que pacientemente me ensinou todas as metodologias necessárias para iniciar o desenvolvimento desse trabalho, e por toda ajuda que me deu sempre que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Nefrologia e Doenças tropicais (LNDDT) pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos, e a acima pela amizade construída ao longo desses anos. Em especial aos amigos Dânya Bandeira, Izabel Bandeira, Louise Tessarolo, Ramon Róseo e Tiago Sampaio, que estiverem diretamente envolvidos na realização desse trabalho. Muito obrigada por todo o incentivo, confiança, pelas

orientações quando me senti sem rumo, e acima de tudo pela paciência e ajuda na realização dos experimentos.

A todos os meus amigos pessoais, especialmente a Aline Parente, pelo apoio constante e por trazerem tanta alegria a minha vida.

Às minhas amigas e companheiras de doutorado, em especial Mariana Brito, muito obrigada pela amizade, carinho, apoio, confiança, cumplicidade, pelos encontros e risadas.

À Banca examinadora, pelo aceite ao convite.

A CAPES e FUNCAP, por todo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

A Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, por toda atenção e disponibilidade na realização das microscopias.

A todos os professores e funcionários que, juntos, compõem o curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFC, obrigado pela dedicação e ensinamentos.

A todos meus sinceros agradecimentos.

**“A vida está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar  
e de correr o risco de viver seus sonhos”.**

**(Paulo Coelho)**

## RESUMO

**ESTUDO *in vitro* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA BATROXICIDINA-CATELICIDINA DA GLÂNDULA DE VENENO DA SERPENTE *Bothrops atrox*.**  
Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2017.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. Existem atualmente, dois medicamentos disponíveis para o tratamento da doença, o nifurtimox e o benznidazol. Ambos são tóxicos e apresentam eficácia limitada, sendo necessária a busca de novas alternativas terapêuticas. Os peptídios antimicrobianos (PAMs) podem ser alternativas potenciais aos tratamentos convencionais já disponíveis, pois eles apresentam mecanismo de ação rápido, baixa probabilidade de desenvolvimento da resistência e podem atuar em conjunto com esquema de fármacos existentes. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Batroxidina (BatxC), um peptídeo relacionado à catalicidina da glândula de veneno da serpente *Bothrops atrox*, sobre as formas diferentes formas evolutivas de cepas Y de *Trypanosoma cruzi*. O tratamento com BatxC em 24,48 e 72h, causou diminuição da viabilidade dos parasitos em praticamente todas as concentrações estudadas (1,56; 3,12;6,25; 12,5;25 e 50 $\mu$ M) com um IC<sub>50</sub> de 11,3; 6,33 e 9,6  $\mu$ M respectivamente, com índice de seletividade de 315. Ensaio com as formas tripomastigotas em diferentes concentrações (0,045; 0,09; 0,18; 0,39; 0,78 e 1,56  $\mu$ M), demonstraram que o BatxC é tóxico a partir das concentrações de 0,18  $\mu$ M, aproximando-se 100% de letalidade na concentração de 1,56  $\mu$ M. Finalizando os ensaios de toxicidade do BatxC, ensaios em formas amastigotas também foram realizados após estudo da citotoxicidade em células LLC-MK2 e RAW264.7, mostrando que nas concentrações testadas (0,44 e 0,88  $\mu$ M) em 24 h, houve uma redução de 40% e 45% de células infectadas, respectivamente. Em 48h não houve diminuição do percentual de infecção das células. O percentual de inibição das formas amastigotas tratadas com BatxC foi de 33% (IC<sub>50</sub>) e 43,5% (2xIC<sub>50</sub>) em 24h, e 23% (IC<sub>50</sub>) e 33% (2xIC<sub>50</sub>) em 48h. Esses resultados demonstraram uma redução do índice de sobrevivência de formas amastigotas. Posteriormente, ensaios de citometria de fluxo com Anexina V-PE e 7-aminoactinomicina (7-AAD), demonstraram uma maior população de parasitos marcados com 7-AAD, nas concentrações avaliadas IC<sub>50</sub> (11,3 $\mu$ M) e 2x IC<sub>50</sub> (22,6 $\mu$ M) demonstrando que a morte induzida pela BatxC é predominantemente por necrose. Em seguida foram realizados ensaios com DCF e Rodamina 123, para investigar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e alteração do potencial de membrana mitocondrial, na morte celular induzida por BatxC. Os resultados obtidos demonstraram que houve um aumento dos EROS e alteração do potencial transmembranico mitocondrial. A via de morte celular de *T.cruzi* por um mecanismo necrótico foi finalmente confirmada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que demonstrou perda de integridade da membrana celular. Em conclusão, a BatxC inibiu todas as formas evolutivas de cepa Y de *T. cruzi*, com alto índice de seletividade, induzindo necrose.

**Palavras-chave:** Batroxidina; *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas.

## ABSTRACT

**In vitro STUDY OF THE TRIPANOCIDE ACTIVITY OF BATROXICIDIN-CATHALICIDIN OF THE *Bothrops atrox* VENOM GLAND.** Department of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, 2017.

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a potentially fatal disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*. There are two drugs available for the treatment of the disease, nifurtimox and benznidazole. Both are toxic and have limited efficacy, requiring the search for new therapeutic alternatives. Antimicrobial peptides (AMPs) may be potential alternatives to conventional treatments already available, as they have a rapid action mode, a low resistance development and can work with existing drugs. The aim of this study was to investigate the effects of Batroxicidin (BatxC), a cathalicidine peptide of the venom *Bothrops atrox* venom gland, on the different forms of *Trypanosoma cruzi* Y strains. The treatment with BatxC at 24, 48 and 72 h caused a decrease in the viability of the parasites in almost all the studied concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50  $\mu\text{M}$ ) with an  $\text{IC}_{50}$  of 11, 3; (0.045, 0.09, 0.18, 0.39, 0.78 and 1.56  $\mu\text{M}$ ), respectively, with a selectivity index of 315. Assays with trypomastigote forms at different concentrations demonstrated that BatxC is toxic from concentrations of 0.18  $\mu\text{M}$ , approaching 100% lethality at the concentration of 1.56  $\mu\text{M}$ . Amastigote forms were also performed following cytotoxicity study in LLC-MK2 and RAW264.7 cells, showing that the studied concentrations (0.44 and 0.88  $\mu\text{M}$ ) in 24h, was a reduction of 40% and 45% of infected cells, respectively. In 48h, there was no decrease in the percentage of cell infection. The percentage inhibition of amastigote forms treated with BatxC was 33% ( $\text{IC}_{50}$ ) and 43.5% ( $2\times\text{IC}_{50}$ ) in 24h, and 23% ( $\text{IC}_{50}$ ) and 33% ( $2\times\text{IC}_{50}$ ) in 48h. These results demonstrated a reduction in the survival rate of amastigote forms. Subsequently, flow cytometric assays with Annexin V-PE and 7-aminoactinomycin (7-AAD) demonstrated a higher population of 7ADAD-labeled parasites at  $\text{IC}_{50}$  (11.3 $\mu\text{M}$ ) and  $2\times\text{IC}_{50}$  (22.6 $\mu\text{M}$ ) demonstrating that death induced by BatxC was predominantly by necrosis. Then, the experiments were performed with DCF and Rhodamine 123 to investigate the involvement of reactive oxygen species (EROS) and alteration of the mitochondrial membrane potential in cell death mechanism. The results showed that there was an increase in EROS and alteration of mitochondrial transmembrane potential. The *T. cruzi* cell death pathway by a necrotic mechanism was finally confirmed by scanning electron microscopy (SEM) that observed loss of cellular membrane integrity. In conclusion, BatxC inhibited all forms of *T. cruzi* Y strain, with high selectivity index, inducing necrosis.

**Keywords:** Batroxicidin; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Triatomíneo transmissor do <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	17
<b>Figura 2.</b> Distribuição de doença de Chagas no mundo .....	18
<b>Figura 3.</b> Formas evolutivas do ciclo biológico do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	19
<b>Figura 4.</b> Transmissão vetorial e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	21
<b>Figura 5.</b> Histórico natural da evolução da doença de Chagas. ....	23
<b>Figura 6.</b> Estrutura química dos fármacos existentes para a terapia da doença de chagas. .....	25
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de ação proposto do fármaco benzonidazol .....	26
<b>Figura 7.</b> Vias de morte celular por apoptose (A) e necrose(B).....	32
<b>Figura 8.</b> Possíveis alvos e efeitos dos peptídeos antimicrobianos sobre os parasito .....	34
<b>Figura 9.</b> Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.....	43
<b>Figura 10.</b> Ensaio de toxicidade em formas epimastigotas de cepas Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	45
<b>Figura 11.</b> Ensaio de toxicidade em formas tripomastigotas de cepas Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	46
<b>Figura 12.</b> Ensaio em formas amastigotas de cepas Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	47
<b>Figura 13.</b> Ensaio de avaliação de mecanismo de morte celular das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	48
<b>Figura 14.</b> Ensaio de avaliação de potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	48
<b>Figura 15.</b> Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio por formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	49
<b>Figura 16.</b> Ensaio de produção de vesículas ácidas de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	50
<b>Figura 17.</b> Ensaio de microscopia eletrônica de varredura .....	51
<b>Figura 18.</b> Efeito citotóxico da Batroxidina sobre as células LLC-MK <sub>2</sub> após 24 h de tratamento. ....	53
<b>Figura 19.</b> Efeito citotóxico da Batroxidina sobre a linhagem celular RAW após 24 h de tratamento. ....	54
<b>Figura 20.</b> Efeito citotóxico da Batroxidina sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> . 55	
<b>Figura 21.</b> Efeito citotóxico da Batroxidina sobre a forma tripomastigota de <i>T.cruzi</i> .56	
<b>Figura 22.</b> Percentual de células LLC-MK <sub>2</sub> infectadas com formas amastigotas e incubadas com Batroxicina. ....	57
<b>Figura 23.</b> Percentual de amastigotas em células tratadas com BatxC. ....	58
<b>Figura 24.</b> Índice de sobrevivência das formas amastigotas incubadas com Batroxidina. ....	58

<b>Figura 25.</b> Fotomicrográfrica de células LLCM-K <sub>2</sub> infectadas com formas amastigotas de <i>T.cruzi</i> incubadas com Batroxicidina no tempo de 24h .....	59
<b>Figura 26.</b> Perfil de Morte em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . incubadas com Batroxicidina (11,3 uM e 22,6 uM ) em 6h de incubação .....	60
<b>Figura 27.</b> Gráficos Density-plot de distribuição das populações celulares submetidas ao ensaio de investigação de mecanismo de morte celular por citometria de fluxo em 6h de incubação com IC <sub>50</sub> (11,3 uM) e dobro da IC <sub>50</sub> (22,6 uM) .....	61
<b>Figura 28.</b> Perfil de morte em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . incubadas com Batroxicidina (11,3 uM e 22,6 uM ) em 24h de incubação. ....	62
<b>Figura 29.</b> Gráficos Density-plot de distribuição das populações celulares submetidas ao ensaio de investigação de mecanismo de morte celular por citometria de fluxo em 6h de incubação com IC <sub>50</sub> (11,3 uM) e dobro da IC <sub>50</sub> (22,6 uM). ....	63
<b>Figura 30.</b> Histograma representativo da emissão de fluorescência de Rodamina 123. ....	64
<b>Figura 31.</b> Histograma representativo do sinal fluorescente de DCFH-DA. ....	65
<b>Figura 32.</b> Fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> marcadas com Laranja de Acridina. ....	66
<b>Figura 33.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de <i>T.cruzi</i> não tratadas após 24h de incubação. ....	67
<b>Figura 34.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de <i>T.cruzi</i> tratadas com a batroxicidina (11,3 μM) após 24h de incubação. ....	68
<b>Figura 35.</b> Efeito citotóxico do Benzonidazol sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> .....	116
<b>Figura 36.</b> Efeito citotóxico do Benzonidazol sobre a forma tripomastigota de <i>T.cruzi</i> . .....	116
<b>Figura 37.</b> Percentual de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas e incubadas com Benzonidazol.....	117
<b>Figura 38.</b> Percentual de amastigotas em células tratadas com Benzonidazol.....	117

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de venenos animais.....	29
<b>Tabela 2.</b> Características químicas da Batroxicidina.....	42
<b>Tabela 3.</b> Efeito da Batroxicidina em <i>Trypanosoma cruzi</i> e células de mamífero.....	106
<b>Tabela 4.</b> Efeito do Benzonidazol em <i>Trypanosoma cruzi</i> e células de mamífero.....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>7-AAD</b>	7-Amino Actinomicina D
<b>Anexina-V</b>	Anexina V- ficoeritrina
<b>BatxC</b>	Batroxicidina
<b>BZ</b>	Benzonidazol
<b>CCC</b>	Cardiomiopatia chagásica crônica
<b>CT</b>	Controle
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DCF</b>	2',7' - diclorofluoresceína
<b>DCFH-DA</b>	Acetato de Fluoresceína
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNDi</b>	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
<b>ECG</b>	Ecocardiograma
<b>EPM</b>	Erro Padrão Médio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>LAFEPE</b>	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
<b>LIT</b>	Meio Liver infusion tryptose
<b>LLC-MK<sub>2</sub></b>	Células <i>Rhesus monkey kidney</i>
<b>LNDT</b>	Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAM</b>	Peptídeos Antimicrobianos
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato
<b>RAW 264.7</b>	Macrófagos murinos de cavidade peritoneal
<b>Rho</b>	Rodamina 123
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

## SÚMARIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Doença de Chagas .....	17
1.2 Venenos animais como fontes de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos .....	27
1.3 Mecanismos de morte celular .....	31
1.4 Peptídeos antimicrobianos e Catelicidinas .....	33
<b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>36</b>
<b>3.OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Objetivo Geral. ....	40
3.2 Objetivos Específicos .....	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 Substâncias .....	42
4.2 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> da Batroxidina .....	42
4.3 Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> da Batroxidina em cepas Y de <i>T. cruzi</i> .....	44
4.3.1 Ensaio em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	44
4.3.2 Ensaio em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	45
4.3.3 Ensaio em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	46
4.4 Avaliação do mecanismo de morte celular induzido por Batroxidina em cepas Y de <i>T. cruzi</i> .....	47
4.4.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico da Batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	47
4.4.2 Alteração do potencial transmembrânico mitocondrial induzido pelo peptídeo Batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	48
4.4.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por Batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	49
4.4.4 Indução de autofagia induzida por batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	49
4.5 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais induzidas por batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	50
4.6 Análise de dados .....	51
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
5.1 Atividade citotóxica do peptídeo Batroxidina sobre células LLC-MK <sub>2</sub> e RAW...53	
5.2 Avaliação da atividade tripanocida do peptídeo Batroxidina .....	54
5.2.1 Efeito da batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	54
5.2.2 Efeito da batroxidina em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	56
5.2.3 Efeito tripanocida <i>in vitro</i> da batroxidina em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	56
5.3 Avaliação do mecanismo de morte celular induzido pela Batroxidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	59
5.3.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico da Batroxidina .....	59
5.3.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	64
5.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	65

5.3.4 Avaliação de indução de autofagia.....	66
5.4 Alterações morfológicas induzidas em formas epimastigotas <i>T. cruzi</i> tratadas com o peptídeo Batroxicidina.....	67
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>97</b>
APÊNDICE A .....	98
APÊNDICE B.....	99
<b>ANEXOS .....</b>	<b>106</b>
ANEXO A .....	107
ANEXO B .....	108
ANEXO C .....	110

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, descoberta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909, é uma doença potencialmente fatal causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, é transmitido por um inseto triatomíneo (**Figura 1**) que se alimenta exclusivamente de sangue, possui popularmente diversas denominações como “barbeiro”, além de outras (AMATO NETO; PASTERNAK, 2009). A DC representa um importante problema de saúde pública. Atualmente no mundo, Cerca de 6 milhões de pessoas são afetadas e aproximadamente 7000 mortes ocorrem anualmente, tornando a Doença de Chagas a maior causa de morte por doença parasitária na América Latina (CHATELAIN *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Triatomíneo transmissor do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: [www.cpqrr.fiocruz.br](http://www.cpqrr.fiocruz.br)

Trata-se de uma doença endêmica, sendo antigamente restrita a região das Américas, principalmente América Latina. No entanto, a doença vem se alastrando por outros continentes, espalhando-se cada vez mais em áreas como a Europa, América do Norte, Japão e Austrália, estando presente atualmente em 21 países. Esse fato deve-se principalmente à migração da população (LESLIE, 2011). Nas últimas décadas, tem sido cada vez mais encontrada nos Estados Unidos da América, estimando-se cerca de 1 milhão de casos e em alguns países europeus, estimando-se cerca de 59-108 mil casos (MORILLA ;ROMERO, 2015; WHO, 2016) (**Figura 2**). Esses fatos deixam para trás o estereotipo de doença zoonótica que afetava exclusivamente a população rural e menos favorecida da América Latina (COURA; VIÑAS, 2010).

**Figura 2.** Distribuição de doença de Chagas no mundo

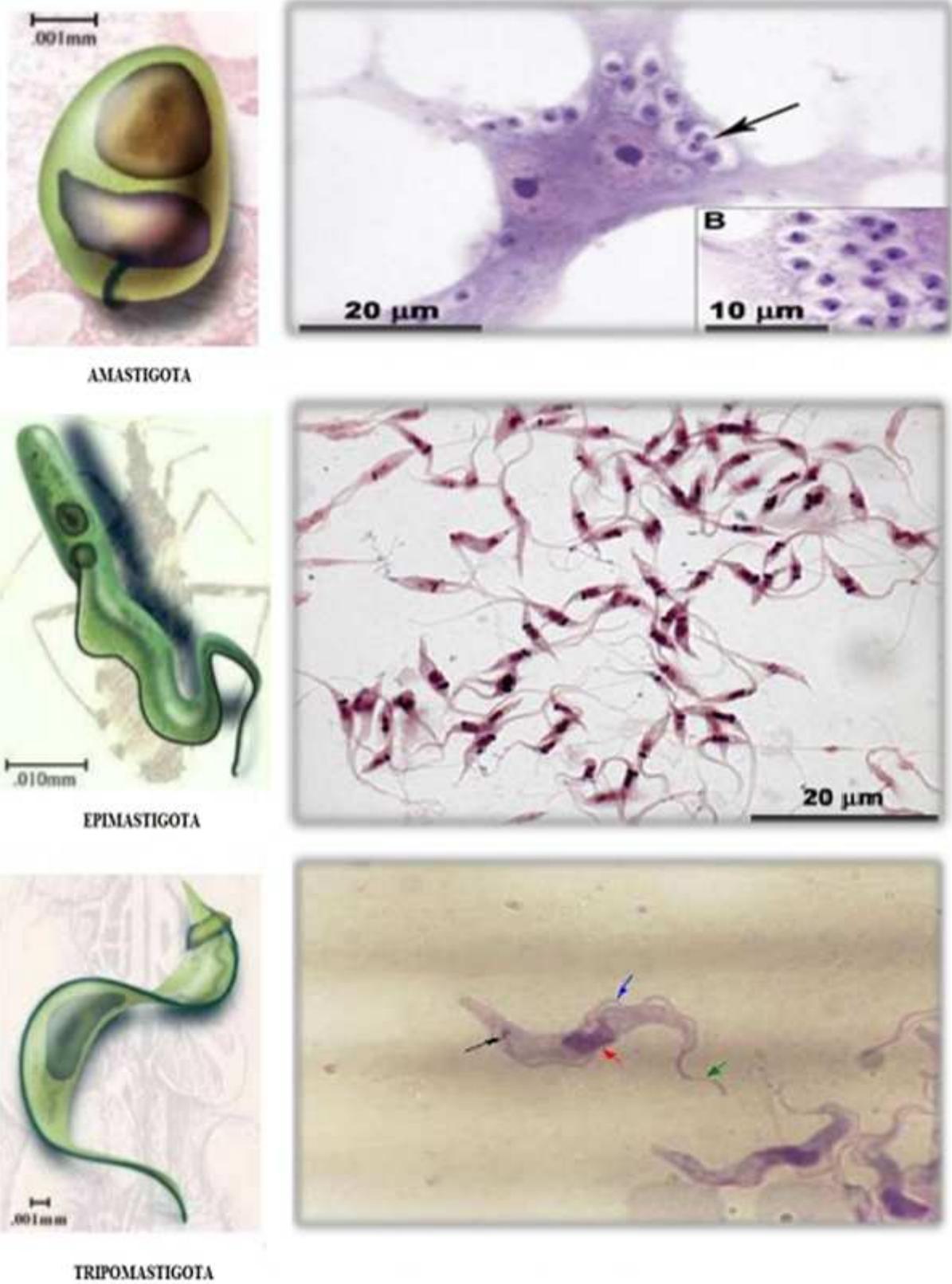


**Fonte:** Adaptado de OMS, 2015.

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário unicelular e parasito obrigatório. Possui um único flagelo (exceto na forma intracelular, que não possui flagelo externo) e uma única mitocôndria, alongada e termina em um cinetoplasto que contem o DNA mitocondrial. É classificado dentro da Ordem Kinetoplastida, da classe zoomastigophorea, que se desenvolve em insetos hematófagos da família Reduviidae, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos (CHAGAS, 1909; RASSI; MARINETTO, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida complexo que requer passagem obrigatória em dois hospedeiros, o inseto vetor triatomíneo, e um hospedeiro vertebrado (BONNEY; ENGMAN, 2010). Durante seu ciclo de desenvolvimento, o parasito apresenta três formas evolutivas morfológica e funcionalmente distintas: epimastigota (forma proliferativa não infectante, presente no intestino médio do inseto), tripomastigota (forma não proliferativa infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto) e amastigota (forma proliferativa intracelular) (**Figura 3**) (ADADE *et al.*, 2013).

**Figura 3.** Morfologia das formas evolutivas do parasito *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Adaptado de SANTOS, 2014.

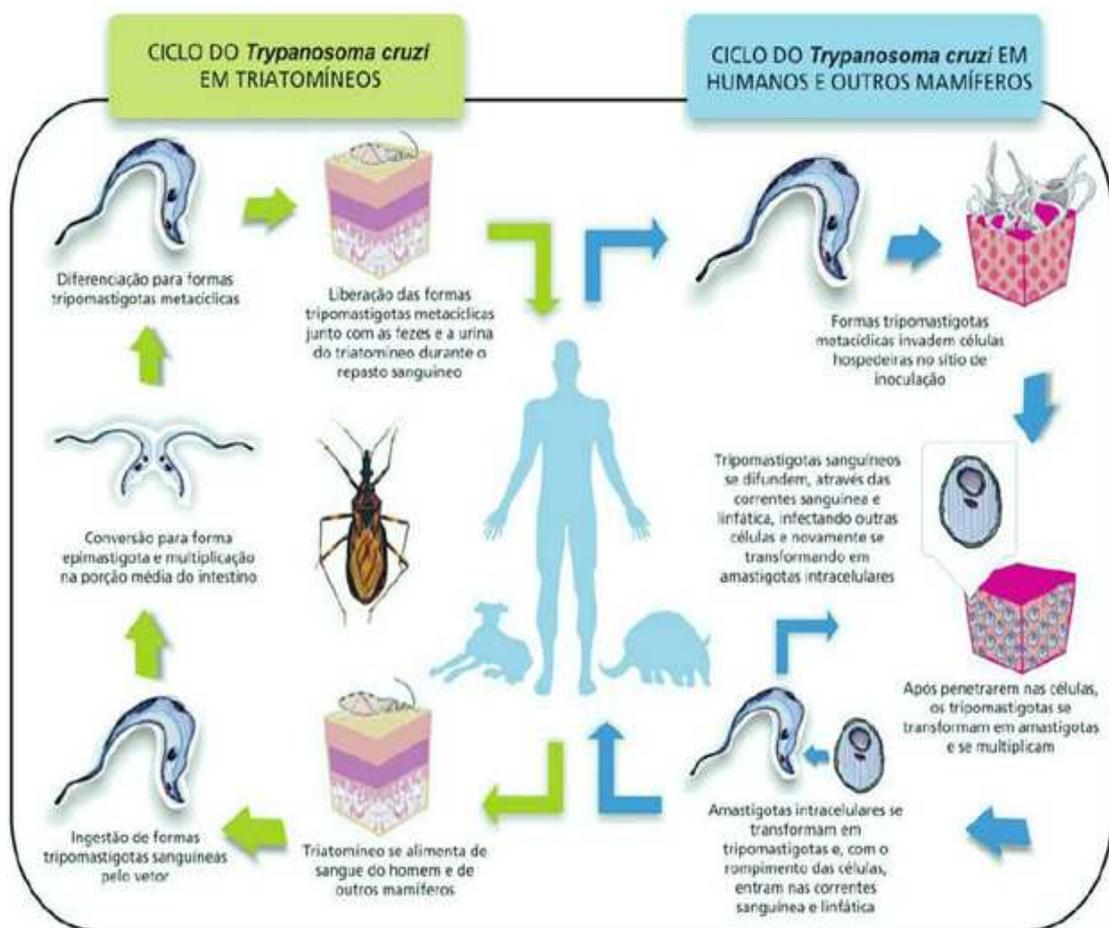
O ciclo do parasito se inicia quando o inseto vetor triatomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado contendo formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, as formas tripomastigotas vão para o estômago do inseto, onde a maioria é lisada por enzimas digestivas (CASTRO *et al.*, 2007). As formas tripomastigotas remanescentes se transformam em formas epimastigotas, que por sua vez migram para o intestino médio do inseto e dividem-se intensivamente por divisão binária mantendo a infecção no vetor (ALVES *et al.*, 2007). Parte desses epimastigotas migra para o intestino posterior onde se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectante para várias espécies de mamíferos. A infecção ocorre quando o triatomíneo ao realizar o repasto sanguíneo deposita junto a região da picada excrementos (fezes e urina) contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas. Uma substância irritante que ocasiona prurido também é liberada pelo inseto. A coceira local faz com que os tripomastigotas metacíclicos sejam arrastados para o orifício da picada pelo próprio hospedeiro vertebrado (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de sobreviver e reproduzir-se em uma variedade de células nucleadas (SILVA *et al.*, 2007), onde se convertem em formas amastigotas; ocorre proliferação intracelular por sucessivas divisões binárias e diferenciação em formas tripomastigotas que rompem a célula e caem na circulação sanguínea (LIMA *et al.*, 2010). Após a ruptura celular, as formas tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea podem infectar células vizinhas, disseminar para outros órgãos ou serem ingeridas por outro inseto vetor reiniciando o ciclo (MUÑOZ-SARAIVA *et al.*, 2012).

A principal forma de transmissão da doença de Chagas ainda é a vetorial, através do contato com os excrementos do triatomíneo infectado (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA, 2007). No Brasil, 52 espécies de triatomíneos foram descritas, destas 27 foram encontradas no nordeste, com maior atenção para espécies de três gêneros distintos, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, sendo estes vetores importantes para a transmissão entre animais domésticos e o homem nas áreas endêmicas (RASSI; MARINETO, 2010). A transfusão sanguínea é o segundo mecanismo mais comum de transmissão da doença (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). A transmissão congênita pode ocorrer em qualquer fase da doença materna e também pode se dar em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre, ou ocorrer durante o parto, pelo contato das

mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (BRASIL, 2012). A infecção pela via oral é responsável por surtos de transmissão em áreas urbanas e regiões onde não há circulação de insetos vetores domiciliados (PEREIRA *et al.*, 2009). Esta via de transmissão é geralmente associada com uma alta concentração parasitária, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa com altos índices de mortalidade. A transmissão por meio de transplante de órgãos tem adquirido relevância nas últimas décadas, devido ao aumento do número desses procedimentos. Essa forma de transmissão apresenta manifestações clínicas graves uma vez que os receptores estão imunocomprometidos (BRASIL, 2012; PEREIRA; NAVARRO, 2013). A **figura 4** ilustra a transmissão vetorial e o ciclo do *T. cruzi* nos dois hospedeiros.

**Figura 4.** Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Adaptado de RASSI; MARIN-NETO, 2010.

A doença de Chagas pode se apresentar em duas fases clínicas definidas: fase aguda e crônica (CHAGAS, 1909). A fase aguda apresenta parasitemia evidente sob observação direta do sangue. Quando a infecção é vetorial podem ser observados os sinais aparentes de porta de entrada que podem ser ocular, conhecido como sinal de Romaña, ou cutâneo, chamado de chagoma de inoculação (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000). Em muitos casos não há sintomas, mas os casos sintomáticos são caracterizados por manifestações como febre, mal-estar, edema facial, hipertrofia dos linfonodos e em situações graves hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). A fase aguda causa morte de 5 a 10% das pessoas infectadas, geralmente envolvendo crianças que morrem de miocardites ou mieloencefalites. Algumas vezes, a doença resolve-se espontaneamente em quatro a seis semanas, mas pode evoluir para a fase crônica (PEREIRA; NAVARRO, 2013; CHATELAIN, 2017).

A fase crônica apresenta duas formas, a indeterminada e a sintomática. Na indeterminada os pacientes podem transmitir para outros, enquanto não mostram sinais da doença, podendo durar de 10 a 30 anos. A forma indeterminada foi descrita por Carlos Chagas em 1985 como assintomática e com resultados normais para eletrocardiograma e raio-x de coração, esôfago e cólon. Apesar do prognóstico parecer bom, cerca de 10 a 30% dos pacientes na fase crônica indeterminada podem evoluir para as formas crônicas determinadas. A fase crônica determinada pode envolver formas cardíacas, digestivas ou mistas (RASSI; MARIN-NETO, 2010; DNDi, 2016).

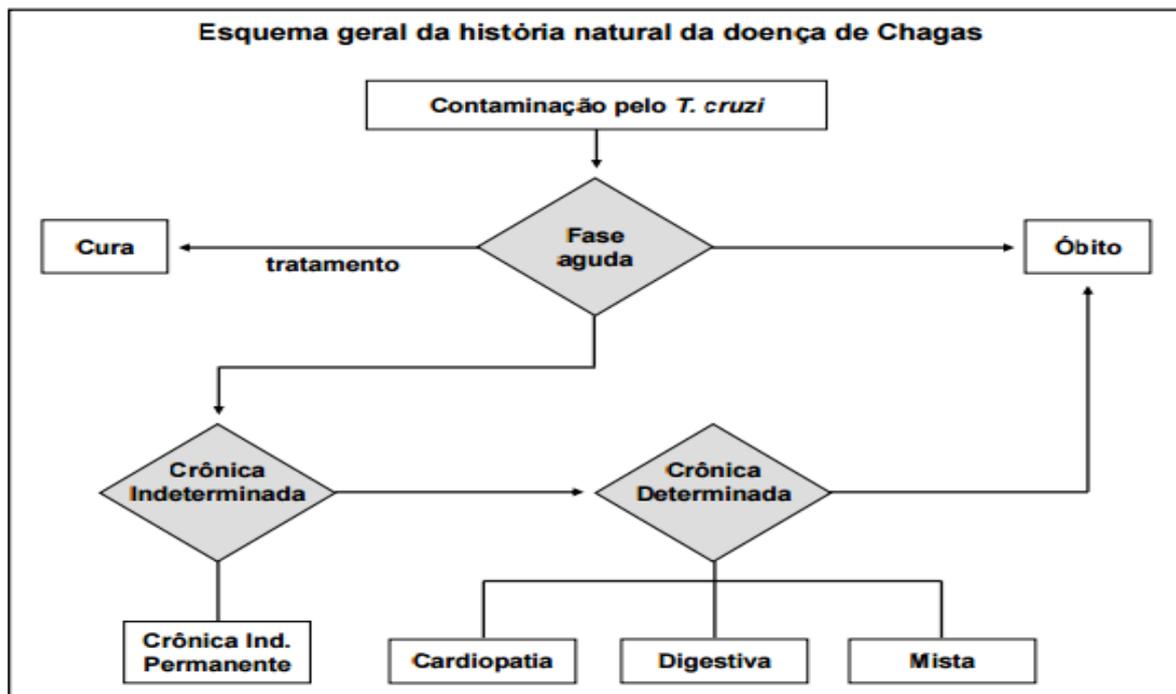
A forma cardíaca é caracterizada por infiltração inflamatória, morte celular e fibrose intersticial reparativa, eventos que levam a distúrbios no sistema de condução cardíaco (bloqueio intraventricular e atrioventricular, disfunção no nódulo sinusal e arritmia ventricular) e miocardite, causando instabilidade elétrica (arritmia atrial), redução da contratilidade (trombose intracavitária e insuficiência cardíaca) e distúrbios microvasculares que podem resultar em morte súbita. Alterações no sistema nervoso intracardíaco podem causar dor torácica atípica e também morte súbita (MARIN-NETO *et al.*, 2007; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Os problemas digestivos são observados em um terço de pacientes chagásicos e usualmente resultam em dilatação do trato gastrointestinal. A forma digestiva é responsável pelo desenvolvimento de mega-síndromes do esôfago (disfagia, dor no peito e regurgitação) e cólon (constipação crônica, dor abdominal e obstrução). O comprometimento do esôfago

inclui a perda do peristaltismo esofágico e falta de relaxamento do esfíncter inferior durante a deglutição, causando progressiva dilatação do órgão. A disfunção esofágica pode ser associada com alterações no trânsito intestinal. Esta forma da doença é caracterizada por destruição de neurônios ganglionares, aumentando a lentidão do trânsito intestinal, levando a hipertrofia muscular e, em casos exacerbados, a dilatação do órgão (LESCURE *et al.*, 2010; PEREIRA; NAVARRO, 2013). Existe a estimativa de 300.000 indivíduos com megacólon no Brasil e os principais sintomas relatados são constipação e impactação fecal. Alterações na secreção intestinal, absorção e motilidade nesses pacientes também foram relatadas, podendo culminar em mega-síndromes. Pacientes com megacólon também podem apresentar dor abdominal, vôlvulo, obstruções e perfurações intestinais (SILVA *et al.*, 2003; PEREIRA e NAVARRO, 2013).

A doença de Chagas não é uma doença fatal nos estágios iniciais, no entanto, as principais causas de morte nesses pacientes são insuficiência cardíaca progressiva (70%) e morte súbita (30%) (CHATELAIN, 2017). Além disso, a doença de Chagas é um contribuinte para a carga global de doenças cardiovasculares, sendo a principal causa de cardiomiopatia infecciosa no mundo (WHO, 2016).

**Figura 5.** Histórico natural da evolução da doença de Chagas.



Fonte: SAGGIA; SANTOS: DIETZE, 2012.

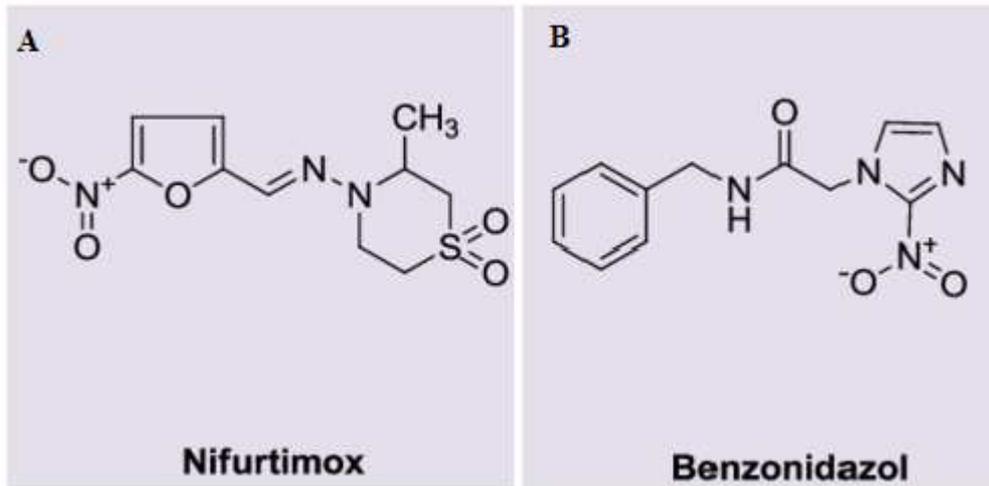
A fase crônica da doença resulta em significativa incapacidade com grande impacto social e econômico. No mundo, o impacto econômico gerado pela doença de Chagas na fase crônica no mundo chega a US \$ 7,19 bilhões por ano (MORILLA; ROMERO, 2015). Somente no Brasil, US \$ 1,3 bilhões são gastos por ano com pacientes em fase crônica da doença de Chagas (DNDi, 2016).

Embora, as questões de saúde relacionadas com doença de Chagas, como a redução da produtividade e a mortalidade, causarem tal impacto econômico, equivalente a vários bilhões de dólares americanos (CHATELAIN, 2017), ainda não existe um tratamento eficaz na fase crônica.

Existem no mercado apenas dois medicamento disponíveis para o tratamento da doença de Chagas. Eles foram desenvolvidos há mais de quarenta anos, sendo eles o nifurtimox, produzido em 1967 e o benzonidazol, introduzido na terapêutica em 1972 entretanto, a eficácia terapêutica é especialmente dependente da fase da doença na qual o tratamento foi instituído. O nifurtimox (Nfx) (**figura 6A**), um derivado nitrofurano, primeiro a ser indicado para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas, foi lançado pelo Laboratório Bayer com o nome comercial de Lampit®. Considerado tóxico, teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil (CANÇADO, 2002). E o benzonidazol (Bz) (**Figura 6B**), composto nitroheterocíclico (N-benzil-2nitro-1-imidazolacetaminda) produzido, inicialmente, pelo Laboratório Roche com o nome comercial de Rochagan® ou Rodanil® e agora produzido pelo Lafepe (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), no Brasil e como Abarax® pelo Laboratório ELEA, na Argentina (MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2013), tornou-se o único medicamento usado no Brasil para tratar esta doença (MORILLA; ROMERO, 2015).

O tratamento disponível atualmente é eficaz logo após a infecção, no início da fase aguda (MORILLA e ROMERO, 2015), porém, uma vez que a doença tenha progredido até as formas indeterminada ou crônica, nenhum medicamento apresenta efetividade satisfatória. A taxa média de cura entre casos agudos e recentes é de 80%, ao passo que é inferior a 20% entre os crônicos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SESTI-COSTA *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento é contra indicado para pacientes com insuficiência renal ou hepática, e durante gravidez (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; MARIN-NETO *et al.*, 2009; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

**Figura 6.** Estrutura química dos fármacos existentes para a terapia da doença de chagas.



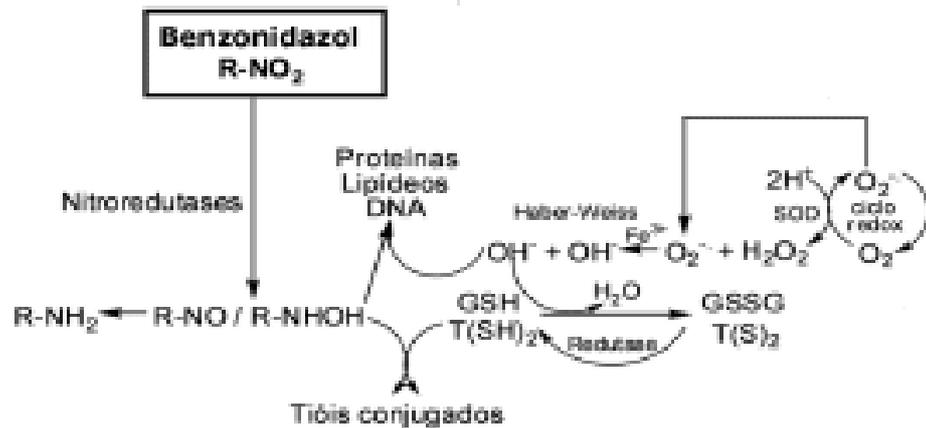
**Fonte:** Adaptado de PITTA; PASCUTTI, 2011.

Mesmo aprovado pelo Ministério da Saúde, o tratamento com benzonidazol além de possuir eficácia limitada, desencadeia muitos efeitos adversos (PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011). Nas primeiras semanas, os efeitos adversos comumente observados em pacientes que utilizam o benzonidazol são reações cutâneas, dentre as quais podem ser citados dermatite atópica, eritomatose, erupções sensíveis à luz, púrpura, febre, perda de peso e distúrbios gastrointestinais. O avançar do tratamento pode culminar em leucopenia, trombocitopenia e distúrbios neurológicos como degeneração neuronal e desmielinização (HIGINO, 2012). A necessidade do emprego deste medicamento em esquemas posológicos prolongados, de pelo menos 60 dias, com doses diárias de 5-7 mg/kg de peso corporal, facilita o surgimento dessas reações (COURA *et al.*, 1997; COURA ; BORGES-PEREIRA, 2012; HASSLOCHER-MORENO, 2012).

O mecanismo de ação do benzonidazol (2-(2-nitroimidazol-1-il)-N-(fenilmetil) acetamida) (**Figura 7**) parece estar relacionado com o grupo nitro, cujo metabolismo nas células hospedeiras inclui a redução a um grupo amino que está associado a geração de intermediários reativos (ex. radical nitro) que podem posteriormente reagir com oxigênio gerando superóxido (WARDMAN, 1985; HALL e WILKINSON, 2012). Superóxido é metabolizado pela enzima superóxido dismutase produzindo peróxido de hidrogênio, que é então detoxificado pela glutathione peroxidase produzindo glutathione oxidada ou por catalase produzindo oxigênio e água. Alternativamente, o superóxido pode ser eliminado por glutathione reduzida, também gerando glutathione oxidada (WINTERBOURN;

METODIEWA, 1994). Adicionalmente, sob certas condições, radicais nitro podem reagir com glutathiona reduzida, consumindo o pool deste antioxidante não proteico (BIAGLOW *et al.*, 1986).

**Figura 6.** Mecanismo de ação proposto do fármaco benzonidazol .



**Fonte:** Adaptado de Dias *et al.*, 2009.

A seletividade farmacológica do benzonidazol ao *T. cruzi* é atribuída ao fato de que as células de mamíferos hospedeiros possuem um maior aporte de mecanismos antioxidantes, quando comparadas às células de *Trypanosoma*. Os sistemas antioxidantes mais importantes são os mediados pelas enzimas superóxido desmutase, catalase, glutathiona peroxidase e glutathiona-S-transferase, e pelas vias do  $\alpha$ -tocoferol e glutathiona, e ainda a metabolização de radicais livres e compostos eletrofílicos por grupos -SH de metalotióis (MAYA *et al.*, 2007). Entretanto, o benzonidazol apresenta marcante toxicidade sobre células hospedeiras, o que indica que os mecanismos detoxificantes intracelulares não são eficazes na proteção das células contra sua ação (RIBEIRO, 2009).

Além disso, o benzonidazol possui baixa permeação na membrana plasmática, sendo necessária uma grande gradiente de concentração para a molécula ter acesso aos amastigotas, forma responsável por manutenção da infecção. A toxicidade e a baixa permeabilidade contribuem para a falha no tratamento na fase crônica (MORILLA; ROMERO, 2015). Com todas essas desvantagens, torna-se necessário a busca de novos fármacos antichagásicos.

## 1.2 Venenos animais como fontes de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos

Apesar dos vários relatos sobre os efeitos tóxicos de venenos animais, estes também têm sido amplamente estudados na busca de novas moléculas farmacologicamente ativas com alguns sucessos notáveis. Dentre eles estão alguns novos fármacos derivados ou inspirados em toxinas ou componentes de venenos que originaram novos medicamentos, como atracurio, captopril, eptifibatide, tirofiban, ziconotida e vários produtos de toxina botulínica (HARVEY, 2014).

Estudos anteriores identificaram na saliva do monstro de gila, *Heloderma suspectus*, dois peptídeos, Exendin-3 e Exendin-4, que estimulam a secreção de insulina em resposta ao aumento da glicemia e modulam esvaziamento gástrico para retardar a entrada de açúcares ingeridos no sangue. O Exendin-4 foi utilizado para o desenvolvimento de um medicamento, Exenatida®, aprovado para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 pela Food and Drug Administration (FDA) em 2005 (JOY; RODGERS; SCATES, 2005).

Foi também identificado o veneno do molusco marinho *Conus magusi* uma neurotoxina,  $\omega$ -conopeptídeo MVIIA. Esta toxina e seu equivalente sintético ziconotida, bloqueiam canais de cálcio sensíveis à voltagem tipo-N em neurônios sensoriais de dor de mamíferos e, portanto, possui potente ação anti-nociceptiva em condições em que a morfina é pouco ou não ativa. Ziconotida (Prialt®) foi aprovado para o tratamento da dor crônica severa por infusão intratecal pela FDA em 2004 (POPE; DEER, 2013).

As toxinas botulínicas A e B, desenvolvidas a partir de toxinas microbianas do *Clostridium botulinum*, uma bactéria patogênica anaeróbia, Gram positiva, bacilo formador de esporos, que produz potentes exotoxinas neurologicamente dirigidas. Oito tipos sorológicos (A, B, C1, C2, D, E, F e G) são reconhecidos de acordo com a especificidade antigênica de cada exotoxina. Mais somente os sorotipos A (Botox®, Xeomin®) e B (Myobloc®) estão disponível no mercado, e ao mesmo tempo em que têm funções muito semelhantes, eles são antígenicamente muito diferente o que permite que aqueles poucos que desenvolveram anticorpos para ainda beneficiar de um tratamento da neurotoxina (GUERRA NETO, 2016). Essas toxinas foram aprovadas para uso clínico para tratar pacientes com uma variedade de condições causadas pela superatividade de neurônios. Ao restringir as toxinas por injeções localizadas e através da sua absorção seletiva em determinados nervos, as toxinas botulínicas são usadas com sucesso em estrabismo,

distonias, hiperidrose, amenizar e prevenir as linhas de expressão (ABRAMS; HALLETT, 2013; MATAK; LACKOVI, 2014).

As toxinas de serpentes exibem uma infinidade de atividades farmacológicas, como miotóxica, neurotóxica, anticoagulante, hipotensora, hemolítica, inibidora da agregação plaquetária, antimicrobiana e atividades pró-inflamatórias (SITPRIJA, 2012).

As desintegrinas, componentes dos venenos de serpentes são inibidores diretos da trombina, compostos fibrinolíticos e ativadores de plasminogênio. Integrilin®, cujo princípio ativo é o eptifibatide, foi obtido a partir do veneno da cascavel Pigmeu (*Sistrurus miliaris barbouri*), é uma desintegrina que inibe agregação plaquetária por ligação com alta afinidade ao receptor fibrinogênio (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) através de um reconhecimento da seqüência Lys-Gly-Asp. Ela foi aprovada em 1998 pela FDA para uso como anticoagulante em pacientes com síndrome coronariana aguda e para os pacientes submetidos a angioplastia (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006).

Do veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi isolado o peptídeo potencializador de bradicinina, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) que origina angiotensina II, um hormônio que causa vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Este peptídeo inibidor se liga ao sítio ativo da ECA de forma semelhante aos substratos naturais e reduz a pressão arterial. O captopril, que é amplamente utilizado para tratar a hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, foi desenvolvido após estudos de modelagem molecular a partir deste peptídeo isolado (FERREIRA, 1965; CUSHMAN; ONDETTI, 1999).

TABELA 1 - EXEMPLOS DE MEDICAMENTOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE VENENOS ANIMAIS				
Fármaco	Toxina	Uso terapêutico	Fonte	Referencia Bibliográfica
<b>Eptifibatide (Integrilin®)</b>	Integrina $\alpha$ IIb $\beta$ 3	Anticoagulante	Serpente <i>Sistrurus miliaris barbour</i>	BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006
<b>Botox® e Xeomin®</b>	Toxina Botulínica tipo A	Estético, disfunções urológicas, neurológicas e uso na pratica odontológica.	Bactéria patogênica <i>Clostridium butolinium</i>	MATAK; LACKOVIC, 2014
<b>Myobloc®</b>	Toxina Botulínica tipo B	Estético, disfunções urológicas, neurológicas e uso na pratica odontológica. (Pacientes resistentes a toxina do tipo A)	Bactéria patogênica <i>Clostridium butolinium</i>	ABRAMS; HALLET,2013
<b>Captopril</b>	Enzima Conversora de Angiotensina	Antihipertensivo	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	FERREIRA, 1965
<b>Ziconotida (Prialt®)</b>	$\omega$ -cono-peptideo MVIIA	Tratamento da dor crônica	Molusco marinho <i>Conus magus</i>	POPE; DEER, 2013

**Fonte:** Adaptado de Beeton; Gutman; Chandy,2006.

Por causa de sua grande variedade de efeitos farmacológicos, como por exemplo, o antimicrobiano (TORRES *et al.*, 2010), diversos grupos de pesquisa vêm buscando novos agentes antiparasitários em venenos, com resultados promissores, como o veneno de *Bothrops moojeni* que apresentou efeito sobre formas promastigotas de *Leishmania spp.* (TEMPONE *et al.*, 2001), o veneno de *B. lutzi* e *B. leucurus* que mostraram efeito sobre formas promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* (TORRES *et al.*, 2010a; MENEZES *et al.*, 2012) e *B. marajoensis* que mostrou efeito sobre formas promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (TORRES *et al.*, 2010b).

O veneno de *B. jararaca*, também inibiu o crescimento de *T. cruzi* e *L. major* (GONÇALVES *et al.*, 2002), sugerindo mecanismo de morte celular programada para formas epimastigotas de *T. cruzi* (DEOLINDO *et al.*, 2005), efeito que foi posteriormente atribuído à sua fração LAAO (DEOLINDO *et al.*, 2010).

Entretanto, para serem considerados potenciais agentes antichagásicos, as novas moléculas precisam superar dois grandes desafios, a efetividade contra os amastigotas intracelulares e alta seletividade ao parasita (MORILLA; ROMERO, 2015).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é facilmente reproduzido *in vitro*, permitindo a utilização de qualquer uma das formas evolutivas do parasito para a avaliação da sensibilidade do parasito a diferentes substâncias. Devido à capacidade de *T. cruzi* de infectar uma grande variedade de células, diversos tipos celulares podem ser utilizados para avaliação da atividade tripanocida de novos compostos. Entretanto, de forma diferente do que é observado para estudos de fármacos antibacterianos, cujos protocolos de avaliação da sensibilidade dos microrganismos a antibióticos *in vitro* estão muito bem estabelecidos, não há consenso com relação aos procedimentos de avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de compostos *in vitro* (LUNA *et al.*, 2010; MORENO *et al.*, 2010).

Em 2010, a partir de um encontro que reuniu especialistas mundiais que representam instituições acadêmicas, públicas, industriais e não governamentais de diferentes partes do Brasil, Austrália, Coréia, Panamá e Estados Unidos, foi desenvolvido pelo PIDC/Fiocruz e DNDi um guia de protocolos para avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade anti-*T. cruzi* de novas substâncias (ROMANHA *et al.*, 2010). As recomendações para estudo *in vitro* incluíram a utilização de determinadas formas evolutivas e cepas do parasito, tipos celulares, ensaios de toxicidade e procedimentos automatizados, que visem observar o tipo de morte do parasito induzida pela substância em estudo (ROMANHA *et al.*, 2010). Geralmente as avaliações são feitas utilizando metodologias diferentes, com variados tipos celulares e distintas cepas ou clones do parasito.

### 1.3 Mecanismos de morte celular

O processo de morte celular corresponde à perda de funções celulares, provenientes de alterações morfológicas, bioquímicas e/ou moleculares (VANDEN BERGUE *et al.*, 2013).

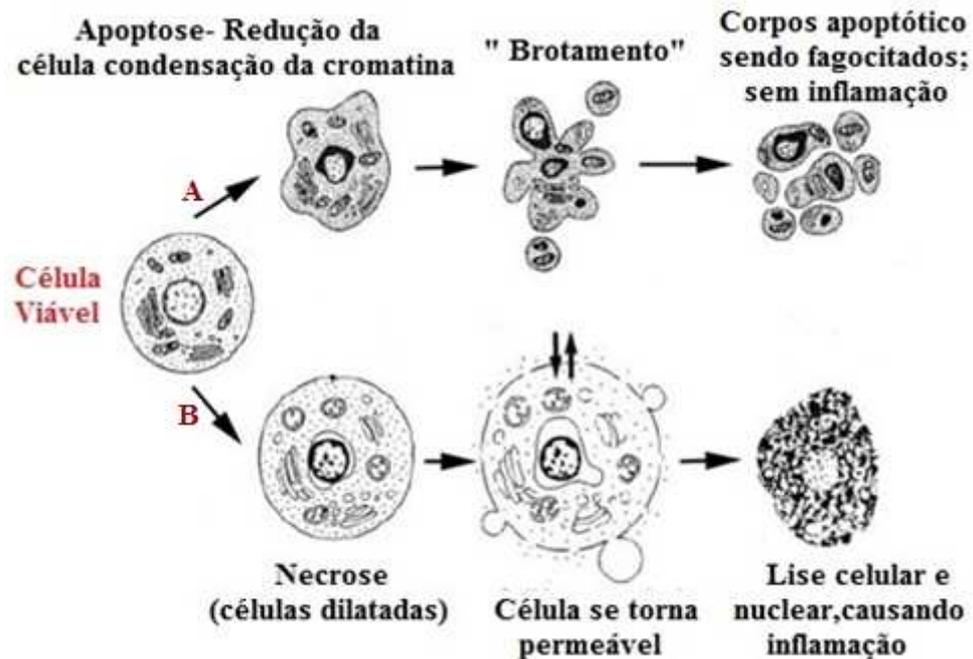
O processo conhecido como necrose é um processo passivo de morte celular de caráter degenerativo (**figura 7**), decorrente de eventos como lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento, levando a alterações na integridade de membrana citoplasmática, aumento do volume celular, colapso da produção de ATP e perda das demais funções biológicas (KRYSCO *et al.*, 2011). Esse mecanismo constitui uma forma acidental de morte celular cujas principais características morfológicas são aumento do volume celular, agregação de cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática, lise celular precoce com consequente liberação do conteúdo citoplasmático causando dano às células vizinhas além de uma reação inflamatória local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A morte celular programada, apoptose (**figura 7**), é um processo ativo regulado geneticamente e é fundamental para a homeostase dos organismos metazoários, desempenhando um papel fundamental na morfogênese, fisiologia e defesa do hospedeiro contra diferentes patógenos, inclusive evitando uma resposta inflamatória (GUIMARÃES; LINDEN, 2004). Com base em critérios de morfologia e nas condições ambientais, a morte celular programada tem sido caracterizada em diferentes tipos, tais como apoptose e autofagia (KROEMER *et al.*, 2009).

Uma vez desencadeada, a apoptose é principalmente caracterizada pela retração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA cromossômico, inchaço mitocondrial com alterações no potencial de membrana e permeabilidade, exposição de resíduos de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, ativação de caspases, formação de protuberâncias da membrana plasmática e a embalagem de constituintes intracelulares em vesículas apoptóticas (GUIMARÃES; LINDEN, 2004). Esta forma de morte celular tem como principais características a ausência de liberação de conteúdo celular, a ausência de reação inflamatória local e dano às células vizinhas e redução do volume celular (WYLLIE; KERR; DURRIE, 1972). Dessa forma, funciona como um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual regulada por proteínas que são expressas

pelas próprias células durante o processo de injúria (ANAZETTI; MELO 2007). Na ausência de fagócitos, como em estudos *in vitro*, apoptose pode progredir para apoptose tardia, também conhecida como necrose secundária (VANDEN BERGHE *et al.*, 2013).

**Figura 7.** Vias de morte celular por apoptose (A) e necrose(B).



**Fonte:** Adaptado de CRUCHTEN, 2002.

Em contraste, a autofagia é uma complexa via de sinalização envolvendo mais de 30 proteínas que funciona para remoção e/ou remodelação de estruturas celulares danificadas. É bioquimicamente caracterizado pelo aumento de vesículas ácidas e morfologicamente pela formação de autofagossomo (vesículas de membrana dupla) que é responsável por englobamento dos constituintes citoplasmáticos, estruturas de membranas concêntricas no citoplasma e organelas ao redor e danos nucleares limitados (ADADE *et al.*, 2013).

Qualquer tipo de injúria celular pode desencadear uma variedade de respostas de adaptação, reparação, proliferação ou morte celular programada ou não programada. Pesquisas experimentais com cultura de células evidenciaram que a exposição destas a um mesmo agente tóxico, como um pro-oxidante, por exemplo, pode desencadear morte celular das mesmas por necrose ou apoptose, a depender da dose e do tempo de exposição ao agente indutor (DYPBUKT, *et al.*, 1994; BONFOCO *et al.*, 1995).

O mecanismo de morte celular pode ser analisado por abordagens farmacológicas/transgênicas, fatores bioquímicos e alterações morfológicas (VANDEN BERGUE *et al.*,

2013). Entretanto, algumas abordagens farmacológicas/ transgênicas em protozoários ainda são desconhecidas, como por exemplo, a expressão de caspases (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009).

Fatores bioquímicos podem ser detectadas por análise de propriedades de dispersão de luz em citometria de fluxo (KRYSCO *et al.*, 2008) e alterações morfológicas podem ser avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (MCMULLAN, 2006).

A morte celular de parasitos vem sendo caracterizada em vários estudos por fatores bioquímicos e alterações morfológicas, sendo estes suficientes para a elucidação do mecanismo de morte (ADADE *et al.*, 2014).

#### **1.4 Peptídeos antimicrobianos e Catelicidinas**

A presença de microrganismos multirresistentes e a necessidade de tratar infecções recorrentes aumentam a pressão sobre o desenvolvimento de antibióticos novos, mais efetivos e seletivos (BRUSSELAERS *et al.*, 2011). Neste contexto, peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem uma alternativa reconhecida aos antibióticos convencionais.

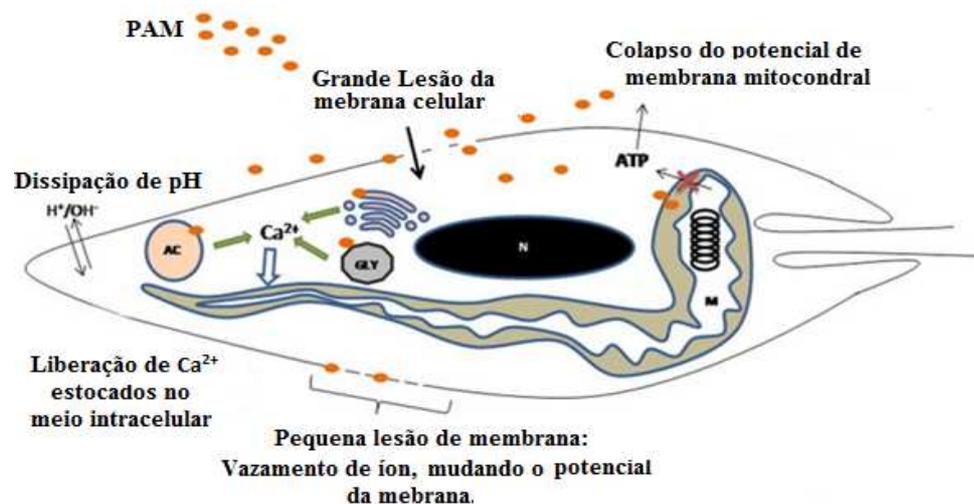
Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são um grupo heterogêneo de proteínas de natureza pequena, catiônica e anfipática em sua maioria, sendo usados pelo sistema imune inato de animais, plantas e seres humanos, como componentes-chave, atuando como primeira linha de defesa imediata contra organismos patogênicos. Estes peptídeos foram selecionados no curso da evolução por sua capacidade de atacar bactérias, fungos, protozoários e vírus (COLE; ANDREU; RIVAS, 1998; ZASLOFF, 2002; LEHRER, 2003; MARÓTI *et al.*, 2011; TORRENT *et al.*, 2013). Em contraste com antibióticos químicos de origem microbiana, produzidos por vias enzimáticas sequenciais, os PAMs eucarióticos originam-se de precursores codificados por genes (TOSSI; ZANETTI *et al.*, 1995; SANDRI, 2002; MANGONI, 2011; ZHU; GAO, 2013) que dão origem a formas maduras, geralmente inferiores a 60 resíduos de aminoácidos e estruturalmente classificadas como lineares ( $\alpha$ -helicoidal ou não-helicoidal), cíclicas ( $\Theta$ -defensinas), e não lineares por números variáveis de pontes dissulfureto internas. Em termos de composição de aminoácidos e carga de superfície, os PAMs podem se apresentar ricos em certos resíduos de aminoácidos (prolina, glicina, triptofano, histidina, lisina ou arginina) conferindo-lhes

níveis variáveis de hidrofobicidade, anfipaticidade, ou, menos frequentemente, carga negativa (ZASLOFF, 2002; TOSSI; SANDRI, 2002).

PAMs e seus derivados sintéticos vêm mostrando, além de efeitos antimicrobianos contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, efeitos antiparasitários contra *T. cruzi*, *Trypanosoma africanos* e *Leishmania spp.*, interagindo e rompendo membranas das células parasitárias, gerando uma maior permeabilidade superficial e desequilíbrio iônico / pH (MCGWIRE; KULKARNI, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

A morte de parasitas mediada por PAMs em alguns casos pode estar relacionada a eventos de sinalização intracelular, iniciado na superfície celular com um tipo de interferência do ligante-receptor ou secundário à ruptura da membrana celular (LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2008; KULKARNI *et al.*, 2009a). Esses peptídeos antimicrobianos também podem causar uma grande deslocalização de cálcio intracelular que é importante na indução da morte celular ao afetar a função da mitocôndria (KULKARNI *et al.*, 2009a). Assim, as organelas de armazenamento intracelular de cálcio nesses parasitas são alvos potenciais. Diferentes PAMs levam à morte celular ao induzir necrose, apoptose e autofagia (BERA *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006,2009a). A sequência precisa de eventos que levam aos diferentes modos da morte celular induzida por peptídeos antimicrobianos ainda não é inteiramente clara, sendo necessários estudos mais detalhados para entender os possíveis mecanismos de ação (MCGWIRE; KULKARNI, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

**Figura 8.** Possíveis alvos e efeitos dos peptídeos antimicrobianos sobre os parasitos.



Fonte: Adaptado de MCGWIRE; KULKARNI, 2010.

Dentre os PAMs envolvidos na defesa inata, as catelicidinas são uma importante família presente em numerosos animais vertebrados, inclusive em humanos (BRANDENBURG *et al.*, 2008). Estas são moléculas multi-efetoras que possuem em comum um pró-peptídeo no segmento N-terminal (cathelin) e um domínio C-terminal variável, que tem propriedades bactericidas (GAO *et al.*, 2015).

Os agentes patogênicos vêm desenvolvendo resistência aos PAMs derivados de vegetais, no entanto, os peptídeos de origem animal podem inibir os microrganismos mais rapidamente e com maior eficiência e por isso vêm sendo alvo no desenvolvimento de novas pesquisas (LEE, *et al.* 2017).

Um estudo publicado recentemente descreve o primeiro PAM isolado de serpentes marinhas com potencial antimicrobiano e anti-inflamatório. Os pesquisadores caracterizaram uma família de catelicidinas a partir da serpente marinha *Hydrophis cyanocinctus*. Dentre os achados, a catelicidina Hc-CATH mostrou eficácia antibacteriana e antifúngica além de diminuída citotoxicidade em células de mamíferos, o que, segundo os autores, faz da proteína um promissor alvo para desenvolvimento de novos antibióticos (WEI *et al.*, 2015).

Recentemente, foi identificado e caracterizado precursores de bibliotecas de cDNA de glândulas de venenos de diversas espécies de serpentes da América do Sul, incluindo *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Lachesis muta muta*, *Bothrops atrox* e *Bothrops Lutzi*. Essas sequências maduras deduzidas destes venenos de serpentes foram denominadas viperidinas (RÁDIS-BAPTISTA, 2015).

Batroxicidina e Crotalicidina, viperidinas dos venenos de *B. atrox* e *C.d. terrificus*, respectivamente, apresentaram efeito antibacteriano, especialmente contra cepas Gram-negativas (FALCÃO *et al.*, 2014). Além disso, a Crotalicidina também mostrou efeitos anti-proliferativos contra várias linhagens de células tumorais (FALCÃO *et al.*, 2015) e um de seus fragmentos mostrou efeito contra leveduras patogênicas (CAVALCANTE *et al.*, 2016).

O efeito antimicrobiano de Batroxidina sugere também um potencial antiparasitário, haja vista que estes efeitos parecem estar relacionados (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Neste trabalho, avaliamos o efeito de Batroxidina contra cepas Y de *Trypanosoma cruzi* e seu mecanismo de ação.

# JUSTIFICATIVA

---

## 2. JUSTIFICATIVA

As doenças podem ser classificadas como globais e negligenciadas. As doenças negligenciadas, como a doença de Chagas, não apresentam investimentos das indústrias farmacêuticas tradicionais em pesquisa e desenvolvimento de terapias, devido à falta de mercado significativo. No entanto essa patologia afeta milhões de indivíduos diversos países. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo (ADADE *et al.*, 2012; VOLPATO *et al.*, 2015, OMS, 2016).

O fármaco atualmente no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol, é eficaz na fase aguda, mas não conseguem erradicar a forma intracelular dos parasitas em fase crônica (MORILLA; ROMERO, 2015). Além disso, esses medicamentos são extremamente tóxicos, causando efeitos adversos indesejáveis na grande maioria dos pacientes (MARIN-NETO *et al.*, 2009). Por esse motivo nas últimas décadas, com o surgimento de parcerias público-privadas e em função dos avanços nas tecnologias e técnicas de descoberta de novas drogas, houve um incentivo na busca de estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitas sem causar tantas complicações para os pacientes acometidos pela doença, além também da necessidade de encontrar um possível tratamento para a fase crônica da doença evitando assim as complicações tardias geradas pela doença de Chagas.

A busca dessas novas moléculas com potencial atividade anti *T.cruzi* tem sido intensificada principalmente no campo de produtos naturais, com ênfase especial em polipéptidos seletivos de venenos animais. Estes polipéptidos provenientes de venenos e as suas frações estimularam muitos estudos para a descoberta de fármacos, com alguns sucessos notáveis (HARVEY, 2014; GAO *et al.*, 2015).

Recentemente, foi identificado e caracterizado catelicidinas de veneno de serpente, que foram denominadas viperidinas (RÁDIS-BAPTISTA, 2016). Dentre essas Viperidinas, a Batroxidina, proveniente do veneno da serpente *B. atrox*. apresenta um excelente potencial na pesquisa contra *Trypanosoma cruzi*, visto que o peptídeo desempenha uma atividade antimicrobiana previamente estudada (FALCÃO *et al.*, 2014).

Tendo em vista todos os problemas no tratamento da doença de Chagas e diante da importância clínica dessa patologia, este trabalho estudou o efeito antiparasitário da

Batroxicidina, focando sua atividade potencial contra *T. cruzi* em todas as formas morfológicas do protozoário.

# **OBJETIVOS**

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial tripanocida da Batroxidina, da glândula de veneno da serpente *Bothrops atrox*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antiparasitário de Batroxidina sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Analisar a toxicidade do peptídeo sobre células hospedeiras (LLC-MK2 e RAW 264.7) e determinar seu índice de seletividade para o parasita;
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido pela Batroxidina em cepa Y de *T. cruzi*;
- Avaliar a produção de EROs citoplasmático e o potencial transmembrânico mitocondrial;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas celulares induzidas pelo peptídeo em cepa Y de *T. cruzi* por microscopia eletrônica de varredura.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Substâncias

A batroxidina (BatxC) foi obtida como descrito por Falcão et al. (2014, 2015). Com estrutura molecular: KRFKKFFKLLKNSVKKRVKKFFRKPRVIGVTFPF-amida e peso molecular de 4258,63 g/mol é um peptídeo antimicrobiano pertencente a classe das catelicidinas, encontrada na glândula de veneno da serpente *Bothrops atrox*, também nomeada viperidina (FALCÃO et al., 2014). As sequências de aminoácidos foram analisadas com os softwares "Peptide property calculator" (<http://www.pepcalc.com>) e "Heliquet" (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr>) (Tabela 2). Benzonidazol (Bz) (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, PM = 260,249 g/mol) foi obtido do Lafepe. As soluções de reserva foram preparadas a 1000mM (1M) com PBS e mantidas a 4°C até serem utilizadas dentro de seis semanas.

**Tabela 2.** Características químicas da Batroxidina.

Peptídeo	Sequencia de aminoácidos	Carga <sup>a</sup>	Hidrofobicidade <sup>b</sup>	Peso Molecular <sup>c</sup>
BatxC	KRFKKFFKLLKNSVKKRVKKFFRKPRVIGVTFPF-amida	+16	0.207	4258,63 g/mol

a - PH neutro, a partir do "Peptide propriedade calculadora" software (<http://pepcalc.com>)

b- Obtido do software "Heliquet" (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr>)

c -FALCÃO et al., 2015.

### 4.2 Avaliação da toxicidade *in vitro* da Batroxidina

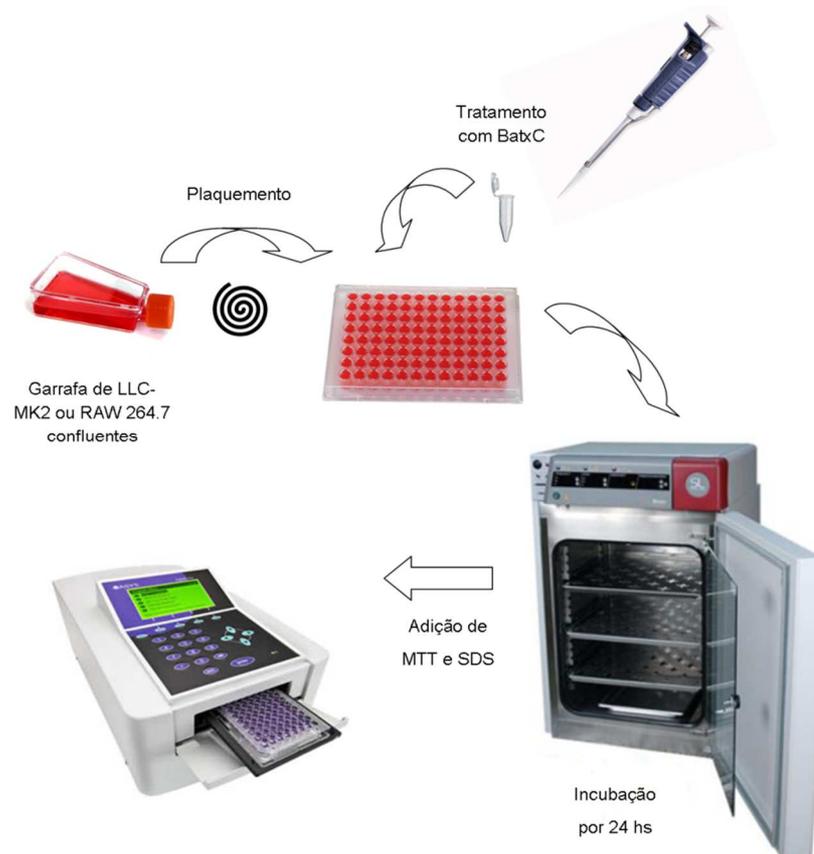
A atividade citotóxica de BatxC sobre células de mamíferos foi realizada em duas linhagens celulares distintas: a linhagem RAW 264.7 (macrófagos murinos) e a linhagem LLC-MK2 (células epiteliais renais de macaco), ambas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Para determinar a viabilidade celular, foi realizado o ensaio do MTT (VANDEN BERGUE et al., 2013), que verifica a capacidade oxirredutiva das células. As células foram cultivadas em placas estéreis de 96 poços na concentração de 10<sup>5</sup> céls/mL em meio DMEM a 10% de soro bovino fetal (SBF) a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir sua adesão. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes

concentrações da BatxC (1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) e Benzonidazol (6, 12, 24, 48, 96 e 192  $\mu\text{M}$ ) e incubadas a 37°C durante 24 horas. O MTT (5 mg/ml em PBS) foi adicionado a cada poço e as placas foram ainda deixadas em repouso por 4 h a 37°C. Finalmente, os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 0,01 N de HCl. Após 17 h, leu-se a absorvância a 570 nm num leitor de microplacas (Biochrom® ASYS Expert Plus) (MENEZES, 2013; UNCITI-BROCETA *et al.*, 2015)

O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle de células não tratadas. A  $\text{IC}_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. A toxicidade do peptídeo sobre as linhagens celulares serviu como base para definir as concentrações de trabalho dos ensaios *in vitro* e para estimar o índice de seletividade de BatxC (NWAKA; HUDSON, 2006).

**Figura 9.** Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 4.3 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* da Batroxidina em cepas Y de *T. cruzi*

A fim de investigar a atividade antiparasitária do peptídeo, ensaios foram realizados nas três formas do ciclo de vida do parasito: epimastigotas, tripomastigotas e amastigota do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados foram comparados à droga de escolha para tratamento da Doença de Chagas no Brasil, o Benzonidazol (BZ).

#### 4.3.1 Ensaio em formas epimastigotas de *T. cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO,1964), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/L) e mantidas em incubadora BOD a 28 °C. Para avaliação do efeito anti-proliferativo de BatxC nestas formas, foram utilizados parasitas provenientes da fase exponencial da cultura inicial.

Formas epimastigotas na concentração de  $10^6$  parasitas/mL na fase *log* de crescimento (ADADE; CHAGAS; SOUTO- PADRÓN, 2012), foram plaqueadas e incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações de BatxC (1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM), quanto de BZ (6, 12, 24, 48, 96 e 192 µM). Após os tempos de 24, 48 e 72 horas, foi realizado a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer (ABE, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2014). Células tratadas com PBS estéril foram consideradas como controle negativo. O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle negativo. A  $IC_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

**Figura 10.** Ensaio de toxicidade em formas epimastigotas de cepas Y de *Trypanosoma cruzi*.



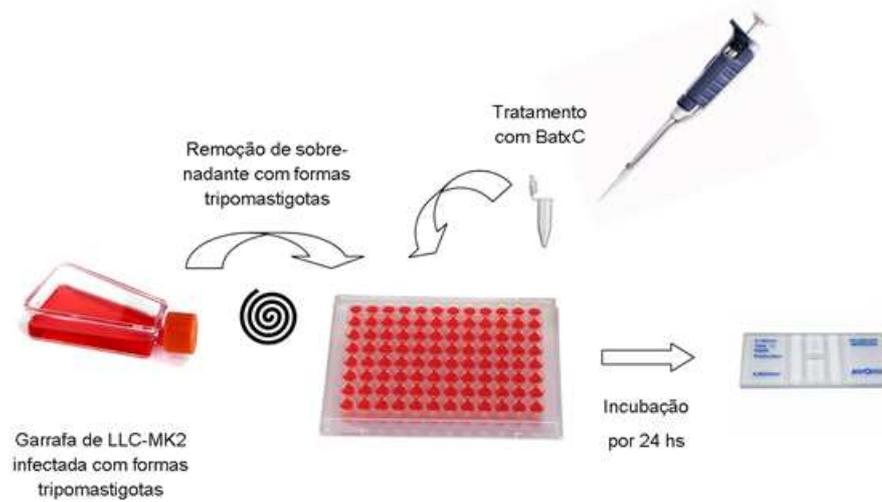
**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.3.2 Ensaio em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir da infecção de cultura de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2) cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido com 2% de Soro Bovino Fetal (SBF). Após de 5 a 8 dias de infecção, o sobrenadante contendo as formas tripomastigotas que eclodiram, foram centrifugadas e ressuspendidas na concentração de  $10^6$  cél/mL. Posteriormente, os tripomastigotas foram incubados em placas de 96 poços e tratados com diferentes concentrações de BatxC (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09 e 0,04  $\mu$ M) e BZ (6, 12, 24, 48, 96 e 192  $\mu$ M). Neste ensaio consideramos como controle negativo células tratadas com PBS estéril (pH 7.4) (ADADE; CHAGAS; SOUTO-PADRÓN, 2012; MEIRA et al., 2015).

A viabilidade foi determinada após 24h de incubação em ambiente com 5%  $\text{CO}_2$  e temperatura de  $37^\circ\text{C}$  utilizando-se a câmara de Neubauer para contagem de parasitos viáveis. O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle negativo. A IC50 (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

**Figura 11.** Ensaio de toxicidade em formas tripomastigotas de cepas Y de *Trypanossoma cruzi*.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

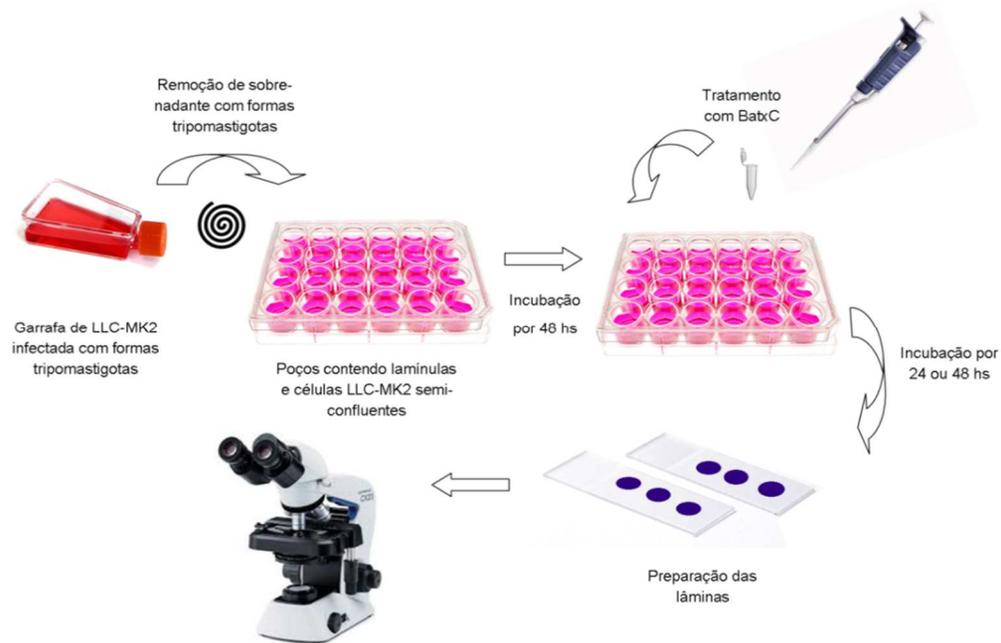
#### 4.3.3 Ensaio em formas amastigotas de *T. cruzi*

Para avaliar o efeito de BatxC na forma amastigota, células LLC-MK<sub>2</sub> foram incubadas ( $5,0 \times 10^6$ /ml) em placas com 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis em meio DMEM e suplementação de SBF 10% em ambiente de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as culturas com células aderidas foram infectadas com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 20:1 e mantidas sob mesmas condições em meio DMEM com suplementação de apenas 2% de SBF.

Para que houvesse internalização dos parasitas e transformação em formas amastigotas intracelulares, aguardou-se um tempo de 48h. O sobrenadante foi desprezado e as culturas foram então tratadas com BatxC (0,44 e 0,88  $\mu$ M), BZ (280 e 560  $\mu$ M) ou PBS por períodos de 24 e 48h. Em seguida, as lamínulas foram lavadas fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa para seguinte montagem em lâminas (ADADE *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2016).

Para determinar o número de amastigotas/100 células e o percentual de células infectadas foi realizado contagem em microscópio óptico em total de 300 células por lamínula em três experimentos independente (PEREZ *et al.*, 2014; HERNÁNDEZ-CHINEA *et al.*, 2015; PEREIRA, 2015).

**Figura 12.** Ensaio em formas amastigotas de cepas Y de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4 Avaliação do mecanismo de morte celular induzido por Batroxidina em cepas Y de *T. cruzi*

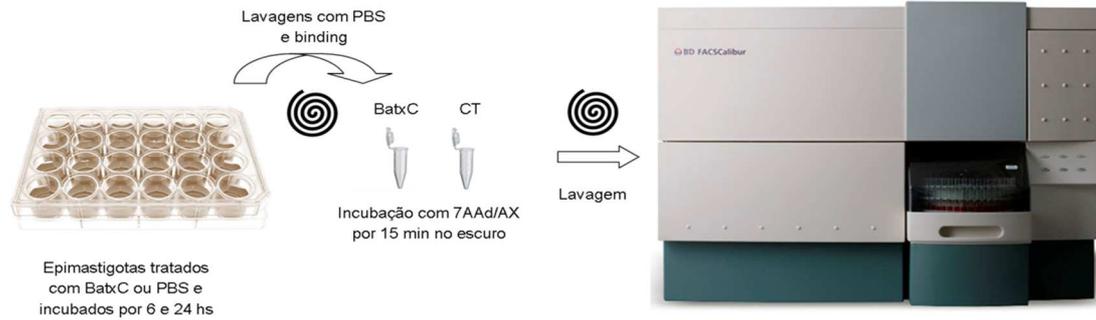
A fim de investigar o mecanismo de morte induzido por BatxC em *T. cruzi*, foram realizados os seguintes ensaios através de citometria de fluxo:

##### 4.4.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico da Batroxidina em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para identificar o potencial necrótico e/ou apoptótico da BatxC, formas epimastigotas foram tratadas com a  $IC_{50}$  (11,3  $\mu$ M) e incubadas por 6 horas e 24 horas em placa de 24 poços. Após esses períodos, as culturas foram lavadas e marcadas com Anexina V-PE (marcador de apoptose por externalização da fosfatidilserina) e 7-AAD (marcador de necrose por lesão de membrana plasmática), utilizando um kit comercial (Sigma-Aldrich). Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

Após 15 minutos de incubação no escuro, os parasitos foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos (ALVES *et al.*, 2008; IZUMI, *et al.*, 2012).

**Figura 13.** Ensaio de avaliação de mecanismo de morte celular das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



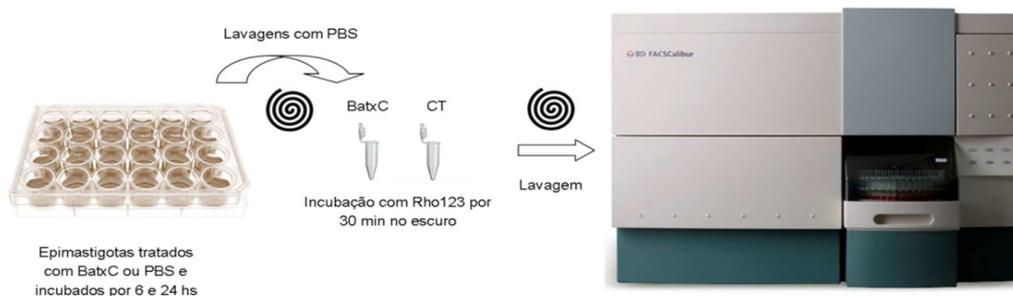
**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.4.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Com o intuito de verificar se BatxC altera o potencial transmembrânico mitocondrial, formas epimastigotas foram tratadas com sua  $IC_{50}$  ( $11,3\mu M$ ) e incubadas por 6h e 24h em placa de 24 poços. Após esse período, as células foram lavadas e marcadas com rodamina (Rho123)  $10\mu g/mL$  por 30 minutos no escuro. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo (SANDES *et al.*, 2014).

A Rh123 é um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias intactas livres de danos, emitindo fluorescência vermelha. Alterações no potencial transmembrânico mitocondrial causa redução do acúmulo do marcador (BARACCA *et al.*, 2003). As células lavadas foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

**Figura 14.** Ensaio de avaliação de potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



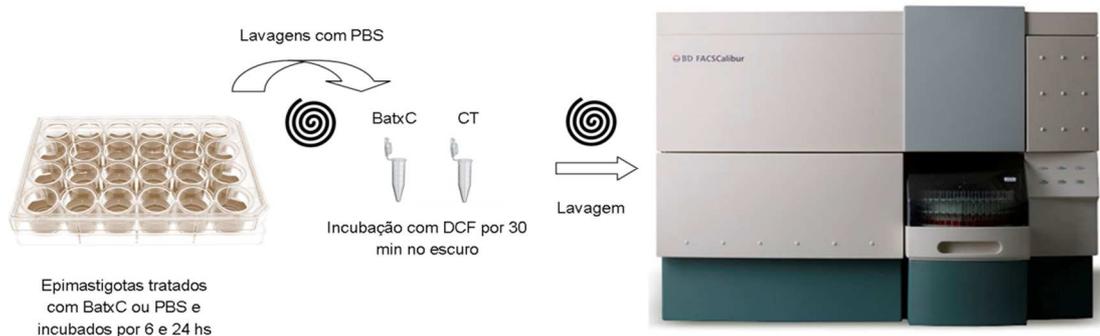
**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.4.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Com intuito de avaliar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (EROS) no efeito da BatxC, formas epimastigotas foram tratadas com sua  $IC_{50}$  (11,3  $\mu$ M) e incubadas por 6h e 24h em placa de 24 poços. Após esse período as células foram lavadas e marcadas com DCF (2',7'-diclorofluoresceína) por 30 minutos no escuro. Na presença de EROs, o DCF apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência. Dessa forma, a fluorescência observada aumenta proporcionalmente à produção de EROs. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

Ao final, os parasitos foram lavados novamente e colhidos para análise por citometria de fluxo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

**Figura 15.** Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio por formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



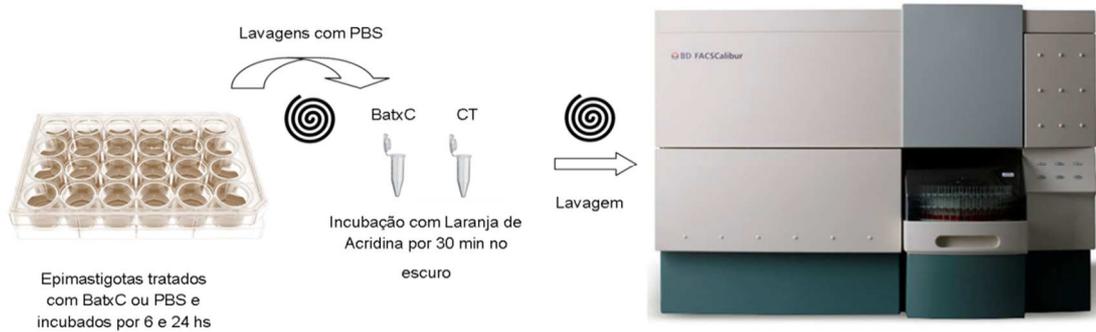
**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.4.4 Avaliação de indução de autofagia

Para investigar se BatxC induz autofagia, formas epimastigotas foram tratadas com sua  $IC_{50}$  (11,3 $\mu$ M) e incubadas por 6 e 24 horas em placa de 24 poços. Após esse período as células foram lavadas e marcadas com laranja de acridina. Esse marcador permite a visualização de organelas vesiculares ácidas, uma vez que é um marcador acidotrópico. Ao penetrar na célula apresenta fluorescência verde e ao ficar retido em organelas ácidas (característica de fagossomo) emite fluorescência vermelha. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

Ao final, os parasitos foram lavados novamente e colhidos para análise por citometria de fluxo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

**Figura 16.** Ensaio de produção de vesículas acídicas de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



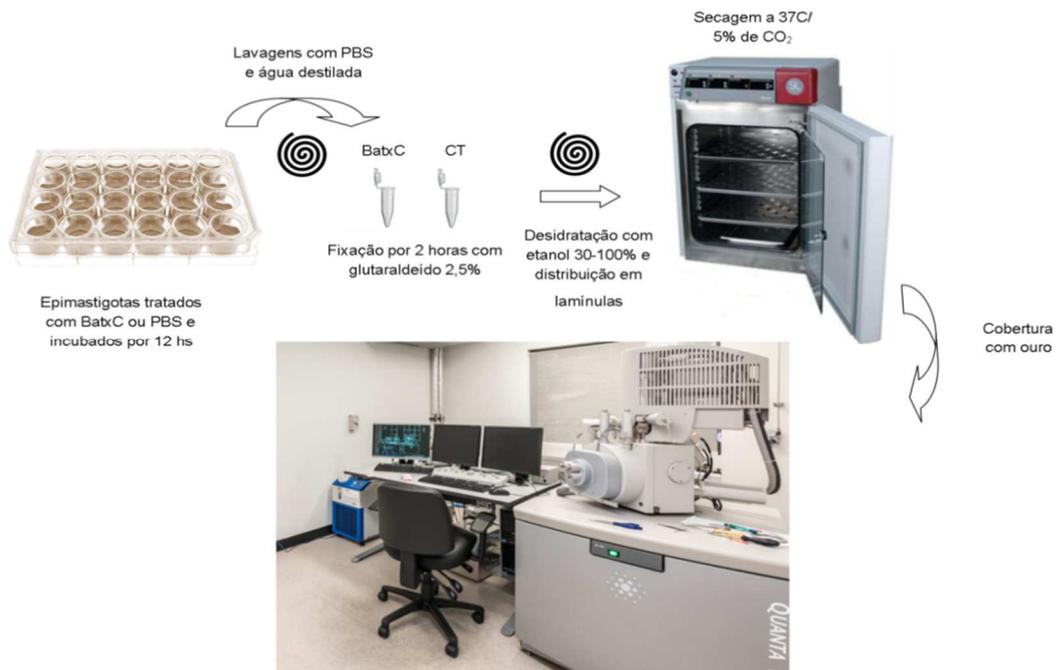
**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.5 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais

Alterações na superfície dos parasitos foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente.

Formas epimastigotas foram incubadas com  $IC_{50}$  de BatxC ( $11,3 \mu M$ ) e incubadas por 12 horas. Após a incubação, os parasitos foram fixados por 2 horas com 2,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavados duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada centrifugando-se a 800g por 10 min. Em seguida, as amostras foram desidratadas e series crescentes de etanol (30-100%), colocadas em lamínulas de vidro, fixadas a  $37^{\circ}C$  com 5% de  $CO_2$ , cobertas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, USA) (LIMA *et al.*, 2016). As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0.

**Figura 17.** Ensaio de microscopia eletrônica de varredura



**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.6 Análise de dados

Os ensaios foram realizados em triplicada de três experimentos independentes e os resultados obtidos expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e os valores de IC<sub>50</sub> determinadas por regressão não linear com intervalo de confiança 95%. Comparações estatísticas foram analisadas utilizando ANOVA com *Dunett's post-test* no programa GraphPad Prism 5.

# RESULTADOS

---

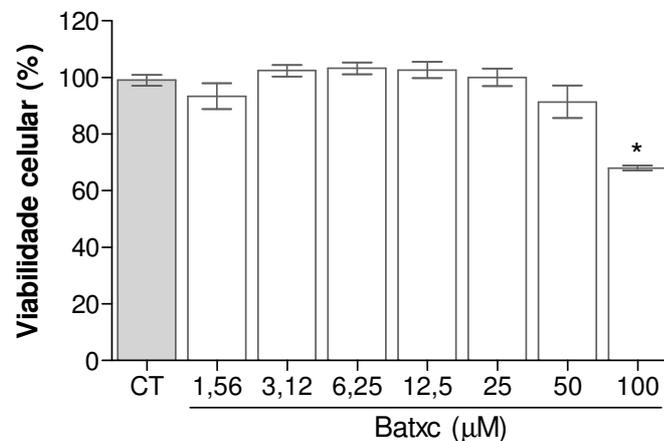
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Atividade citotóxica do peptídeo Batroxidina sobre células LLC-MK<sub>2</sub> e RAW.

Objetivando investigar o efeito citotóxico da batroxidina sobre células hospedeiras; as células LLC-MK<sub>2</sub> foram incubadas por 24 h em diferentes concentrações (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu$ M) do peptídeo e tiveram sua viabilidade determinada pela leitura espectrofotométrica do ensaio de MTT. O ensaio mostrou que o peptídeo não diminuiu a viabilidade celular na maior parte das concentrações testadas (**Figura 18**). Tendo uma diminuição significativa da viabilidade apenas na concentração de 100  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> 138,8  $\mu$ M).

A partir do valor de IC<sub>50</sub> obtido foi possível calcular o Índice de Seletividade (SI), que representa a seletividade da substância ao parasita em relação à célula de mamífero e obtivemos o valor de 315. O índice de seletividade do benzonidazol e de 2.18 (**Anexo A**).

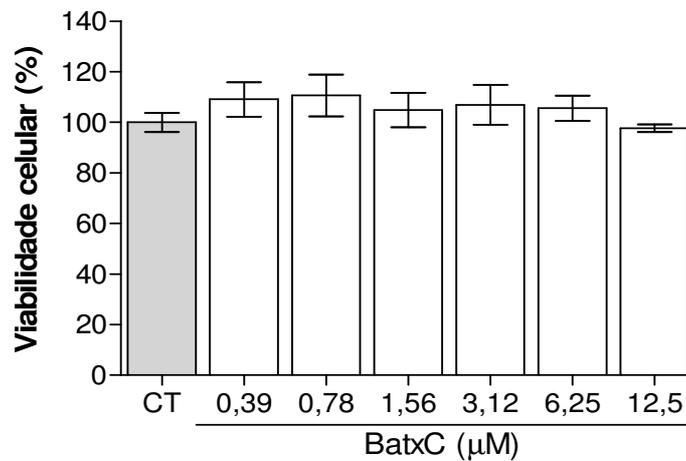
**Figura 18.** Efeito citotóxico da Batroxidina sobre as células LLC-MK<sub>2</sub> após 24 h de tratamento.



**Legenda:** O gráfico representa o percentual de viabilidade celular, expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n=3). O grupo controle foi tratado com PBS. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunnett*, com  $*p < 0,05$ .

O ensaio de MTT também foi realizado em linhagem de células RAW (macrófagos) a fim de determinar a citotoxicidade da batroxidina. O ensaio foi realizado incubando diferentes concentrações do peptídeo BatxC (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ ) por 24h. O ensaio demonstrou que o peptídeo não diminuiu a viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas (**Figura 19**).

**Figura 19.** Efeito citotóxico da Batroxidina sobre a linhagem celular RAW após 24 h de tratamento.



**Legenda:** O gráfico representa o percentual de viabilidade celular, expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes ( $n=3$ ). O grupo controle foi tratado com PBS. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunnett*, com  $*p < 0$ ,

## 5.2 Avaliação da atividade tripanocida do peptídeo Batroxidina

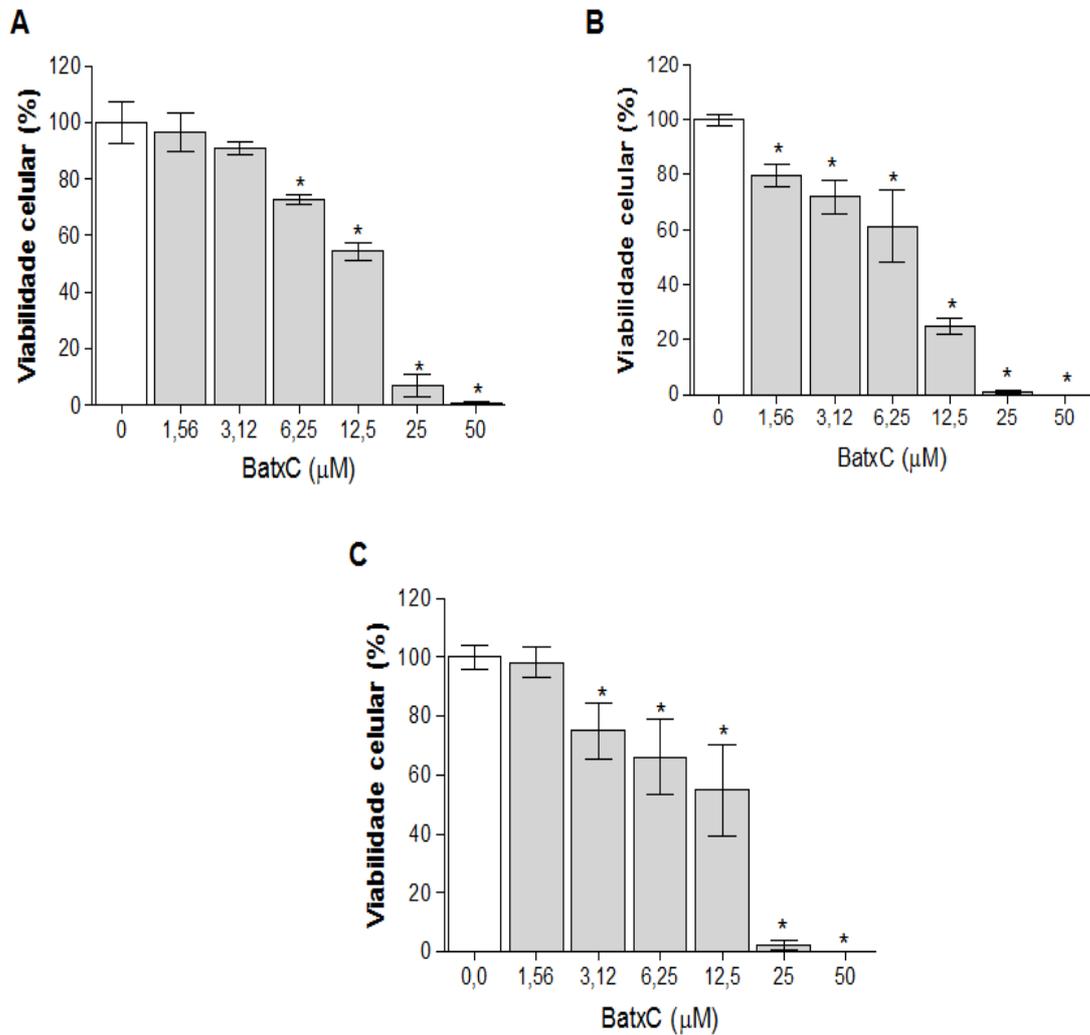
### 5.2.1 Efeito da batroxidina em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios de viabilidade celular da batroxidina sobre as formas epimastigotas foram realizados nos tempos de 24h, 48h e 72h.

Após 24h de tratamento, a BatxC obteve  $\text{IC}_{50}$  de 11,3  $\mu\text{M}$  enquanto o BZ apresenta uma  $\text{IC}_{50}$  de 218 $\mu\text{M}$  (**Figura 20**). No tempo de 48h também houve melhor atividade tripanocida do peptídeo em estudo com  $\text{IC}_{50}$  de 6,33  $\mu\text{M}$  (**Figura 20**). Em relação ao mesmo período de tratamento com o benzonidazol ( $\text{IC}_{50} = 61,1\mu\text{M}$ ) (**Anexo B**). Após 72h de exposição com as formas epimastigotas, o peptídeo foi capaz de inibir 50% do crescimento

parasitário em uma concentração de 9,6  $\mu\text{M}$  enquanto o BZ necessita de uma concentração de 16,5 $\mu\text{M}$  para alcançar o mesmo efeito (**Figura 20**) (**Anexo B**).

**Figura 20.** Efeito citotóxico da Batroxidina sobre a forma epimastigota de *T.cruzi*.



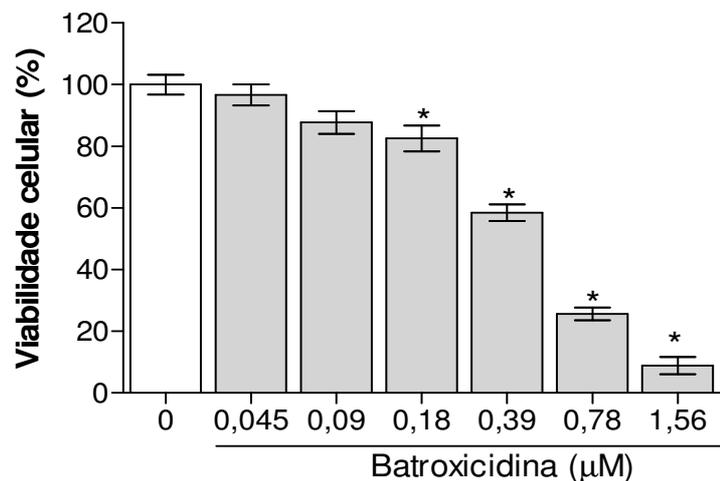
**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24(A), 48(B), e 72h(C) de tratamento com Batroxidina . Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com  $*p < 0,05$ .

### 5.2.2 Efeito da batroxidina em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas, obtidas a partir da eclosão de células LLC-MK2, foram incubadas com diferentes concentrações da Batroxidina (0,045; 0,09; 0,18; 0,39; 0,78 e 1,56  $\mu\text{M}$ ) durante 24h.

De acordo com a **figura 21**, a BatxC apresentou toxicidade para os parasitos a partir das concentrações 0,18  $\mu\text{M}$  e se aproxima de 100% de letalidade na concentração de 1,56 $\mu\text{M}$ , conferindo assim uma  $\text{IC}_{50}$  de 0,44  $\mu\text{M}$ . Para o benzonidazol, a  $\text{IC}_{50}$  é de 282 $\mu\text{M}$  (**Anexo A e B**).

**Figura 21.** Efeito citotóxico da Batroxidina sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.



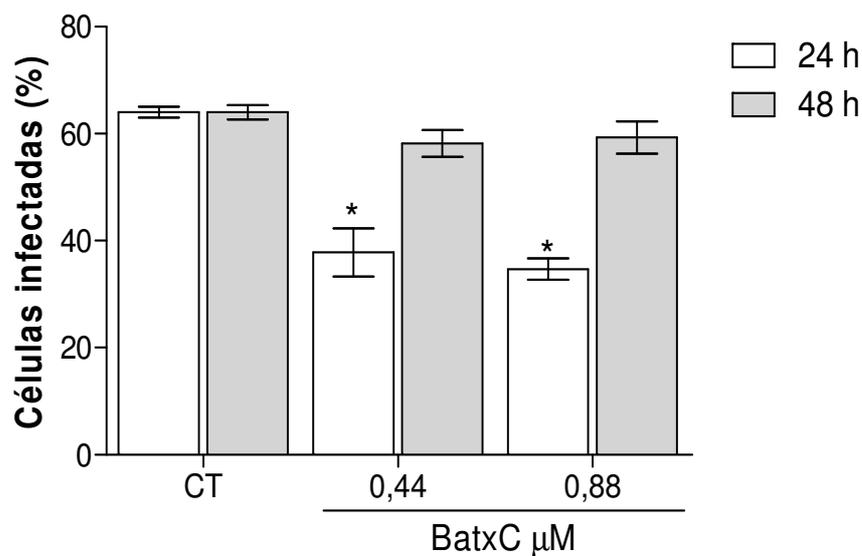
**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes ( $n=3$ ), após 24h de tratamento com Batroxidina. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com  $*p<0,05$ .

### 5.2.3 Efeito tripanocida *in vitro* da batroxidina em formas amastigotas de *T. cruzi*

Para investigar o efeito da Batroxidina sobre a forma intracelular do *Trypanosoma cruzi*, foi realizado ensaio em 24h e 48h, utilizando a  $\text{IC}_{50}$  (0,44  $\mu\text{M}$ ) e dobro da  $\text{IC}_{50}$  (0,88  $\mu\text{M}$ ) dos experimentos em formas tripomastigotas, as concentrações estudadas não são tóxicas para as células hospedeiras LLC-MK2, como já demonstrado em resultados anteriores.

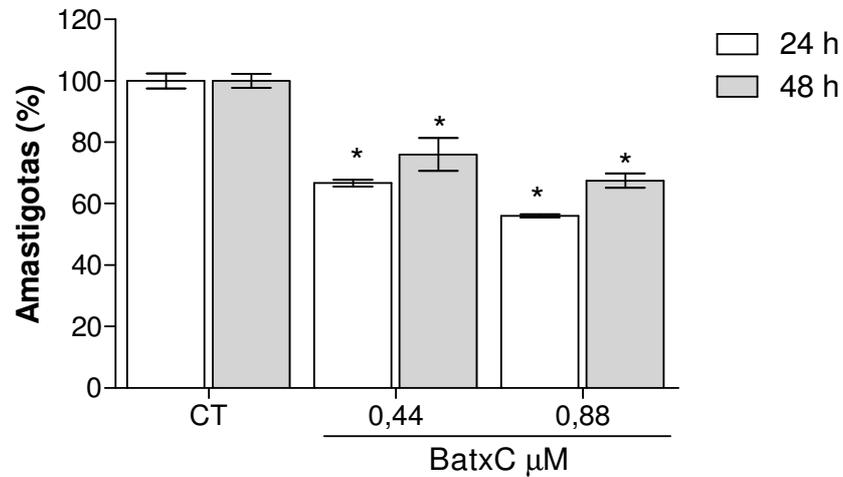
Nas concentrações de 0,44 e 0,88  $\mu\text{M}$  em 24h de incubação com BatxC foi observado uma diminuição de 40% e 45% respectivamente do percentual de células infectadas (**Figura 22**) e redução de 33% e 43,5% do percentual de amastigotas nas células (**Figura 23**). O tratamento com as mesmas concentrações em 48h de incubação, não demonstrou redução significativa do percentual de células infectadas (**Figura 22**), no entanto, houve uma diminuição do percentual de formas amastigotas em 23,9% e 33% (**Figura 23**). A **figura 24** representa o índice de sobrevivência (IS) calculado a partir do percentual de células infectadas e do número de formas amastigotas. Fotomicrografias das culturas de células LLC-MK<sub>2</sub> contendo amastigotas pode ser visualizada **na figura 25**.

**Figura 22.** Percentual de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com formas amastigotas e incubadas com Batroxicidina.



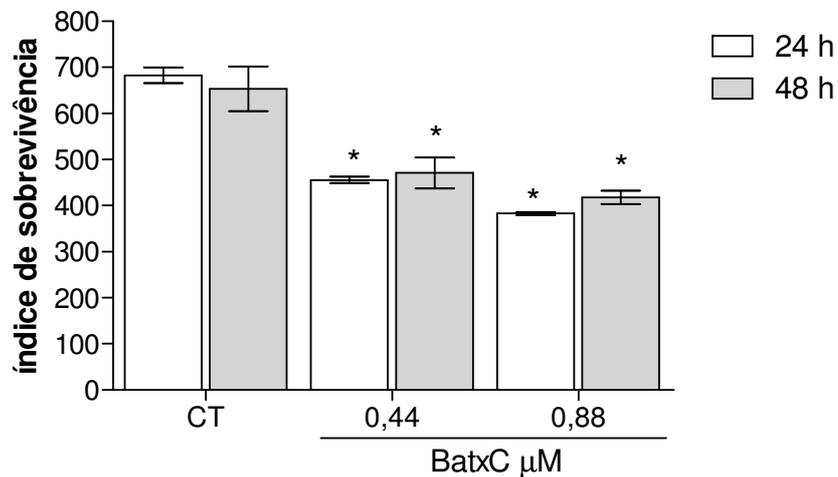
**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n=3) a por teste *Dunnett*, com  $*p < 0,05$ , comparados ao grupo controle.

**Figura 23.** Percentual de amastigotas em células tratadas com BatxC.



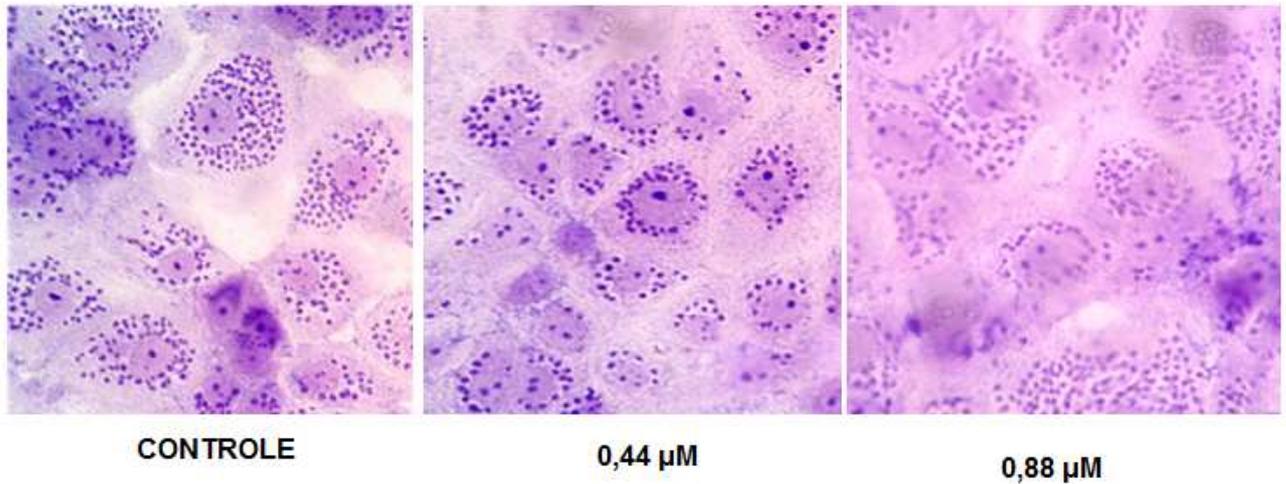
**Legenda:** Os dados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes ( $n=3$ ) após 24 e 48h incubados com Batroxidina nas concentrações de  $\text{IC}_{50}$  ( $0,44\mu\text{M}$ ) e  $2\times\text{IC}_{50}$  ( $0,88\mu\text{M}$ ). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com  $*p<0,05$ .

**Figura 24.** Índice de sobrevivência das formas amastigotas incubadas com Batroxidina.



**Legenda:** Os dados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes ( $n=3$ ), após 24h de incubação com Batroxidina. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com  $*p<0,05$ , comparados ao grupo controle.

**Figura 25.** Fotomicrográfica de células LLCM-K<sub>2</sub> infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi* incubadas com Batroxicidina no tempo de 24h.



**Legenda:** Lâminas obtidas por coloração de Giemsa. Fotomicrografia em aumento de 200x, em microscópio Nikon Eclipse Nis e Software Nis 4.0.

### 5.3 Determinação do mecanismo de morte celular induzido pela Batroxicidina em formas epimastigotas de *T. cruzi*

#### 5.3.1 Potencial necrótico e/ou apoptótico da Batroxicidina

A fim de investigar o possível mecanismo de morte celular induzido pela Batroxicidina, foi realizada a detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana por citometria de fluxo (FACS) utilizando Anexina V-PE e 7-AAD como marcadores.

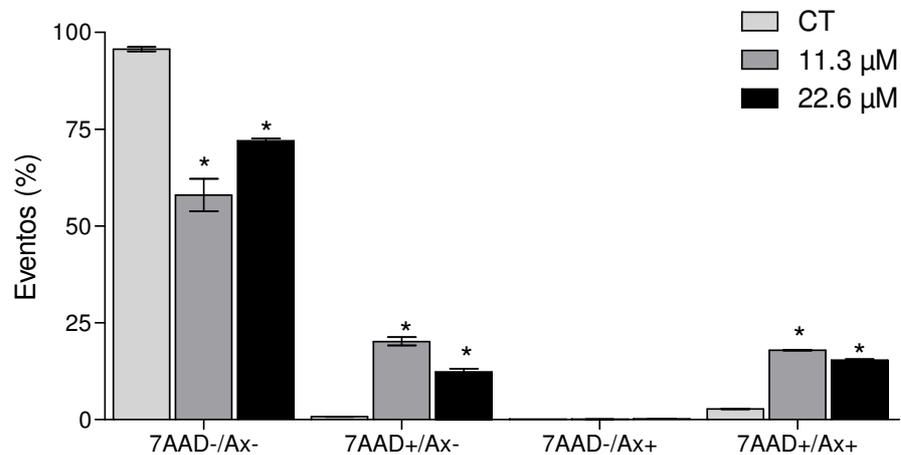
Nesse ensaio formas epimastigotas de *T. Cruzii* foram tratadas com IC<sub>50</sub> da BatxC (11,3µM) e dobro da IC<sub>50</sub> (22,6µM) em diferentes tempos de incubação (6 e 24h) e posteriormente marcadas com Anexina e 7-AAD (**Figura 26, Figura 28**).

De acordo com a **figura 27** os parasitas tratados com BatxC nas concentrações avaliadas em 6 horas de tratamento, resultou no aumento de células marcadas predominantemente com 7-AAD (quadrante superior esquerdo), caracterizando células com perda de permeabilidade de membrana. Houve um aumento da população de 17 e 12% (IC<sub>50</sub> e 2xIC<sub>50</sub>, respectivamente), quando comparadas ao grupo de parasitas não tratado (0,7%).

Quando os parasitas foram tratados por 24h (**Figura 29**), houve um aumento ainda maior da marcação com 7-AAD em ambas as concentrações estudadas, indicando que a

Batroxicidina, induz a morte desses parasitas predominantemente através de um processo celular de necrose.

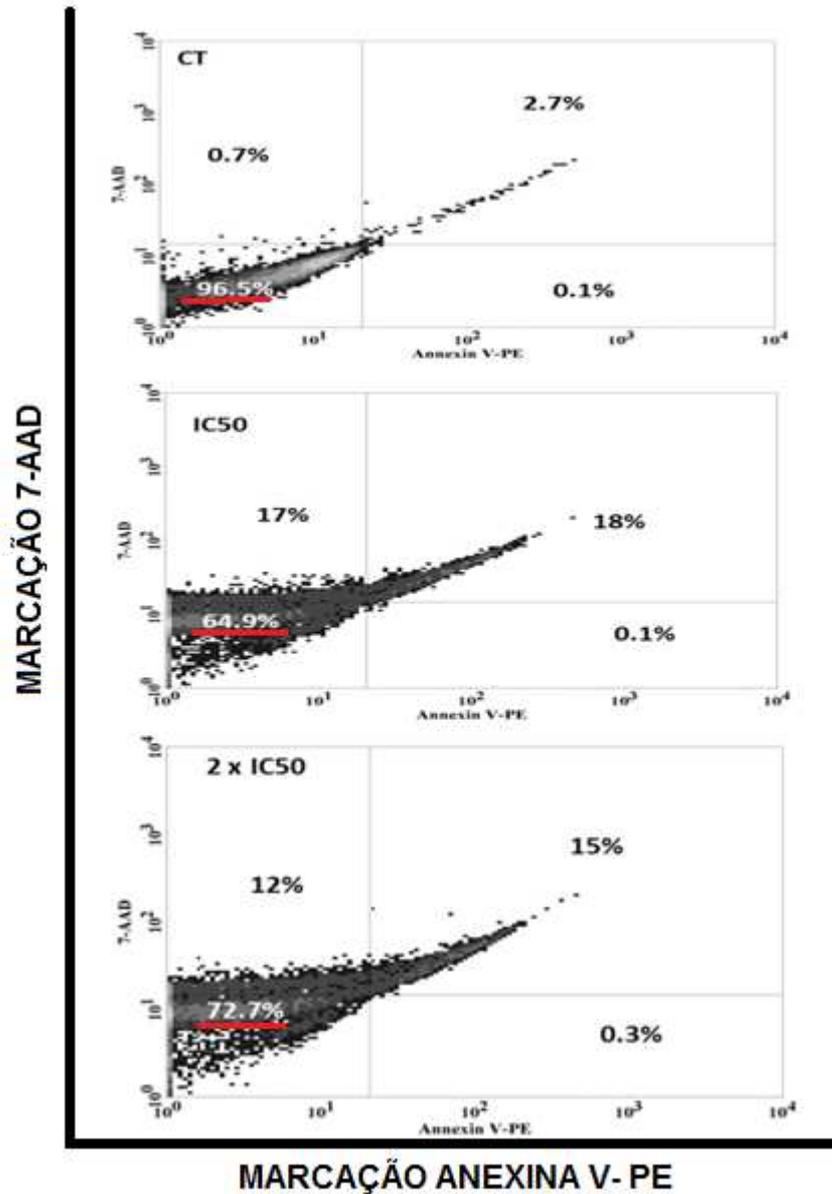
**Figura 26.** Perfil de morte em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 6h de incubação com Batroxicidina.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** Perfil de morte em formas epimastigotas após 6h de incubação com  $IC_{50}$  e dobro da  $IC_{50}$  Batroxicidina. Os dados foram expressos como percentual de eventos  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Dunnet (\* $p < 0,05$  vs. grupo controle). 7AAD-/AX- : células não marcadas; 7AAD+/AX- : marcado com 7-amino actinomicina D; 7AAD-/Ax+ : marcados com anexina V; 7AAD+/AX+ : marcado com 7-AAD e Anexina V-PE). CT: Controle.

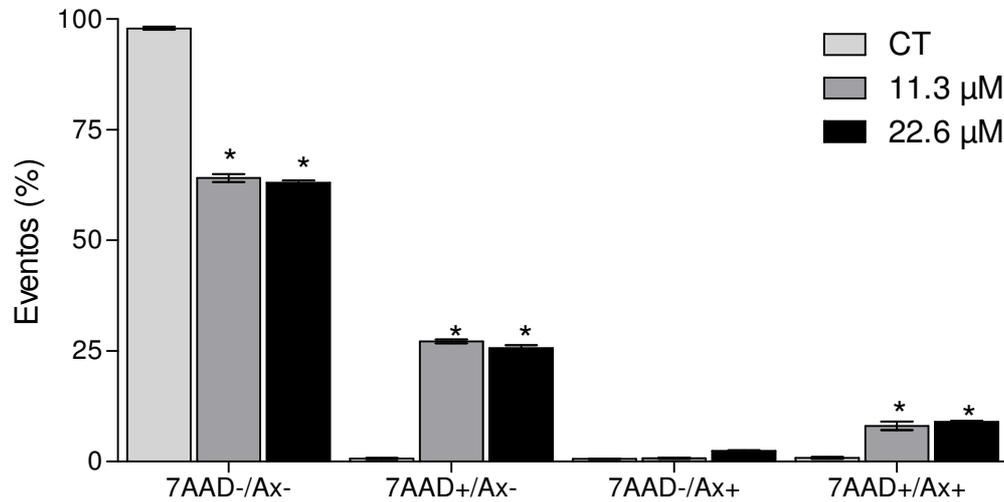
**Figura 27.** Gráficos Density-plot de distribuição das populações celulares submetidas ao ensaio de investigação de mecanismo de morte celular por citometria de fluxo em 6h de incubação com  $IC_{50}$  (11,3  $\mu$ M) e dobro da  $IC_{50}$ (22,6  $\mu$ M).



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** Representação da marcação de Anexina V-PE e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7-AAD; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7-AAD e Anexina V-PE. CT: Controle.

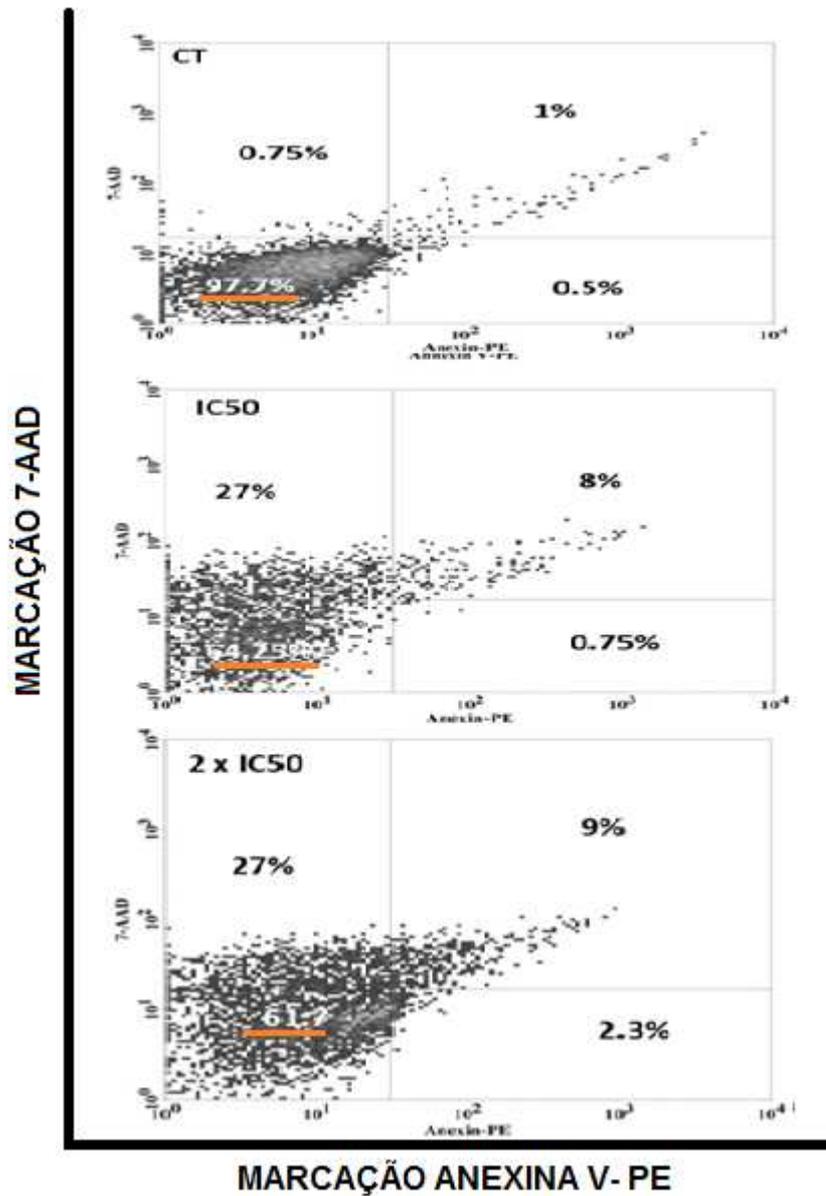
**Figura 28.** Perfil de morte em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24h de incubação com Batroxicidina (11,3 uM e 22,6 uM ).



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** Perfil de morte em formas epimastigotas após 24h de incubação com  $IC_{50}$  e dobro da  $IC_{50}$  Batroxicidina. Os dados foram expressos como percentual de eventos  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Dunnet (\* $p < 0,05$  vs. grupo controle). 7AAD-/AX- : células não marcadas; 7AAD+/AX- : marcado com 7-amino actinomicina D; 7AAD-/Ax+ : marcados com anexina V; 7AAD+/AX+ : marcado com 7-AAD e Anexina V-PE). CT: Controle.

**Figura 29.** Gráficos Density-plot de distribuição das populações celulares submetidas ao ensaio de investigação de mecanismo de morte celular por citometria de fluxo em 6h de incubação com  $IC_{50}$  (11,3  $\mu$ M) e dobro da  $IC_{50}$ (22,6  $\mu$ M).



**Fonte:** Elaborada pelo autor

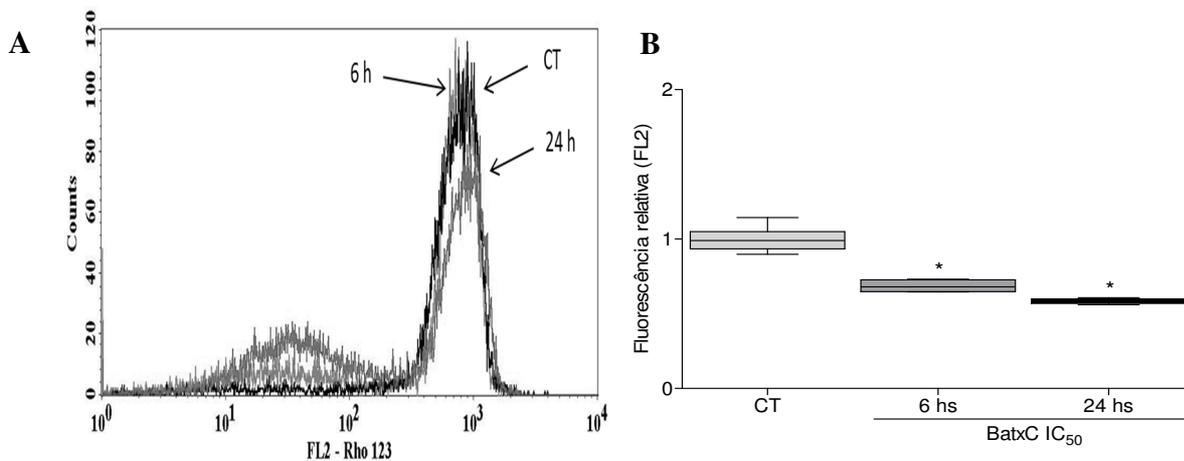
**Legenda:** Representação da marcação de Anexina V-PE e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7-AAD; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7-AAD e Anexina V-PE. CT: Controle.

### 5.3.2 Alteração do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Nesse ensaio, o parasito na sua forma epimastigota foi incubado com rodamina 123 (Rho 123), corante fluorescente específico que se acumula no espaço intermembrana mitocondrial de células viáveis.

Nesse ensaio as formas epimastigotas do parasito foram tratadas com BatxC na concentração de  $11,3\mu\text{M}$  em 6 e 24h. A **figura 30 A** mostra uma diminuição gradual da emissão de fluorescência em células tratadas com Batroxidina (deslocamento à esquerda), quando comparada ao grupo controle não tratado. Após 24h de tratamento esse resultado se torna ainda mais evidente (**figura 30B**), sugerindo que há um dano mitocondrial nesses parasitas tratados com o peptídeo, uma vez que a rodamina se acumula apenas em mitocôndrias intactas. Quando há lesão na organela, portanto, a fluorescência diminui de intensidade indicando despolarização mitocondrial, observado pelo deslocamento da curva de histograma para a esquerda.

**Figura 30.** Histograma representativo da emissão de fluorescência de Rodamina 123.



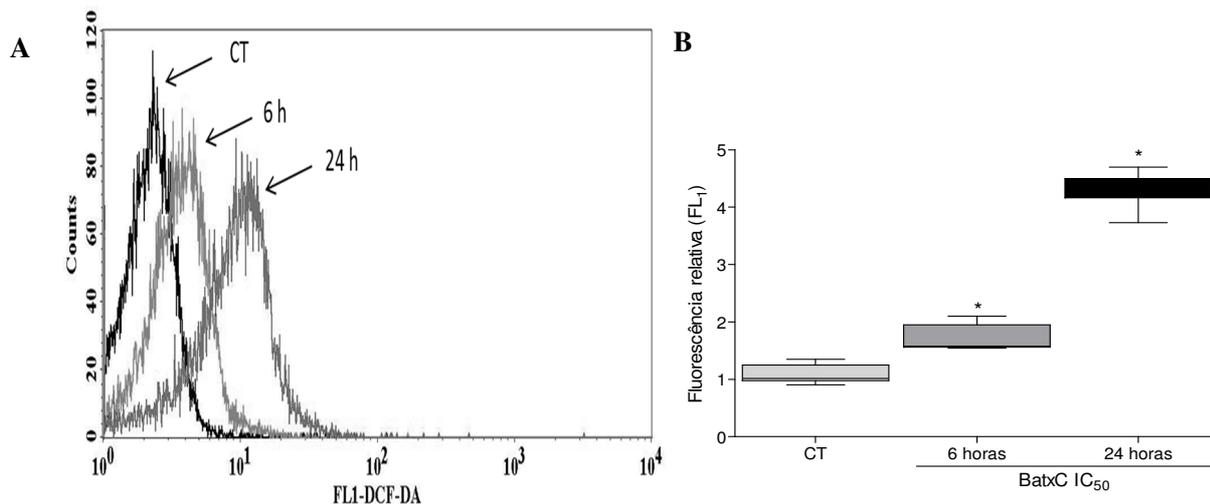
**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** (A) Valores de fluorescência relativa e (B) Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com Batroxidina com  $11,3\mu\text{M}$  (IC<sub>50</sub>) durante 6 e 24 horas. CT: Controle (formas epimastigotas não tratadas). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Dunnet ( $p < 0,05$  vs. grupo controle).

### 5.3.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Com o intuito de investigar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio no processo de morte celular. Formas epimastigotas foram incubadas com 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), que é permeável à membrana celular e não-fluorescente. Na presença de ROS, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que permanece no meio intracelular (SRIVASTAVA *et al.*, 2009). Conforme a **figura 31A**, houve um aumento significativo de células marcadas pelo DCF (deslocamento a direita) quando população é comparada ao grupo controle não tratado, especialmente depois de 24h de incubação com a BatxC (**Figura 31B**). Os resultados confirmam, junto aos resultados anteriores, uma morte predominante desses parasitas por necrose com alteração mitocondrial e produção de EROS.

**Figura 31.** Histograma representativo do sinal fluorescente de DCFH-DA.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

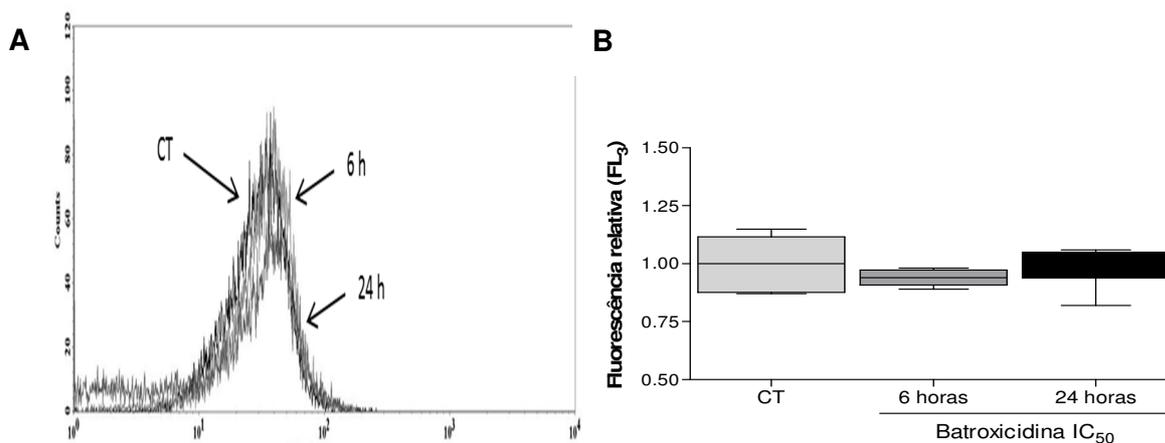
**Legenda:** (A) Valores de fluorescência relativa (B) Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com Batroxidina com 11,3  $\mu$ M (IC<sub>50</sub>) durante 6 e 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo (CT). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Dunnet ( $p < 0,05$  vs. grupo controle).

### 5.3.4 Avaliação de indução de autofagia

A indução de uma via alternativa de morte celular também foi investigada. A autofagia é um processo celular fisiológico para degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas, para manutenção da homeostase celular em condições adversas como privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas. Diversas propriedades e proteínas específicas têm sido utilizadas para quantificação do processo autofágico. Uma propriedade que se aproveita do mecanismo autofágico é o fato de os fagossomos serem organelas ácidas. Assim, pode-se utilizar o corante fluorogênico acidotrópico laranja de acridina para marcar especificamente esses ambientes celulares. A autofagia celular induz a formação de fagossomos onde o marcador se deposita. O corante laranja de acridina cora citoplasma e núcleo celulares com fluorescência verde e, quando em um ambiente ácido, sofre modificações físico-químicas e passa a emitir fluorescência vermelha. Logo, células com uma fluorescência vermelha elevada detectadas em citometria de fluxo são caracterizadas como células realizando autofagia.

Neste ensaio foram marcadas com laranja de acridina, após 6 e 24h de incubação com 11,3 $\mu$ M de BatxC. Os resultados não evidenciaram processo autofágico induzido pela Batroxicidina, uma vez que não houve diferença significativa na emissão de fluorescência do grupo tratado em comparação ao não tratado (**Figura 32 A e B**).

**Figura 32.** Fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Laranja de Acridina.



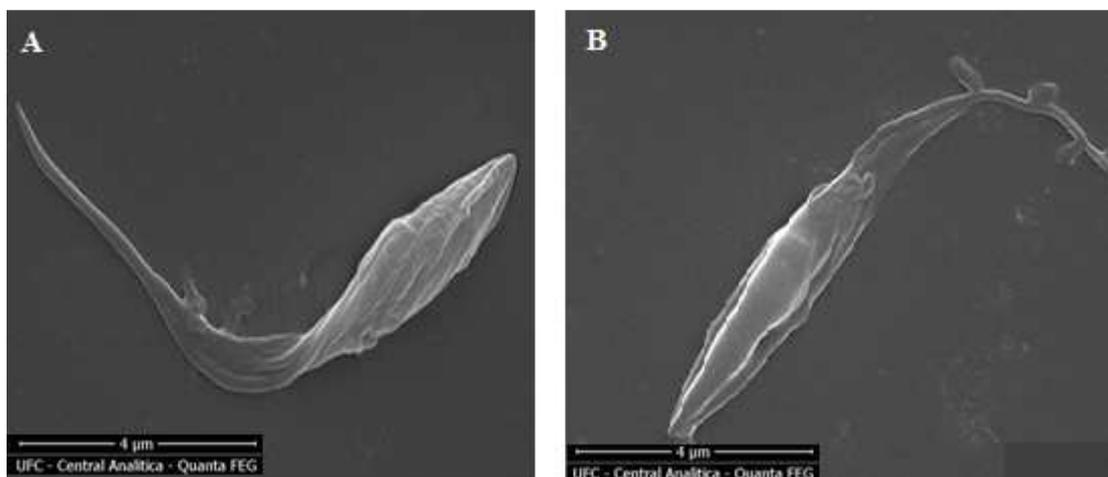
**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** (A) Valores de fluorescência relativa (B) Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com a com 11,3  $\mu$ M em 6 e 24 horas. CT:Controle. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Dunnet ( $p < 0,05$  vs. grupo controle).

#### 5.4 Alterações morfológicas induzidas em formas epimastigotas *T. cruzi* tratadas com o peptídeo Batroxidina.

As análises por microscopia eletrônica de varredura em formas epimastigotas não tratadas e tratadas com Batroxidina (11,3 $\mu$ M) durante 24h de incubação evidenciaram alterações morfológicas provocados pelo peptídeo ao parasito, confirmando que o processo de necrose é o principal mecanismo de morte do *T.cruzi* expostos ao peptídeo BatxC. A **figura 33** mostra que o grupo controle não tratado apresenta parasitos intactos com organelas e membranas bem preservadas. Os parasitos tratados com a Batroxidina (**Figura 34**) apresentam alterações visíveis de degradação completa da cauda (**Figura 34A**), modificação importante da forma (**Figura 34B**), formação de poro na membrana celular e extravasamento do conteúdo celular (**Figura 34 C-E**).

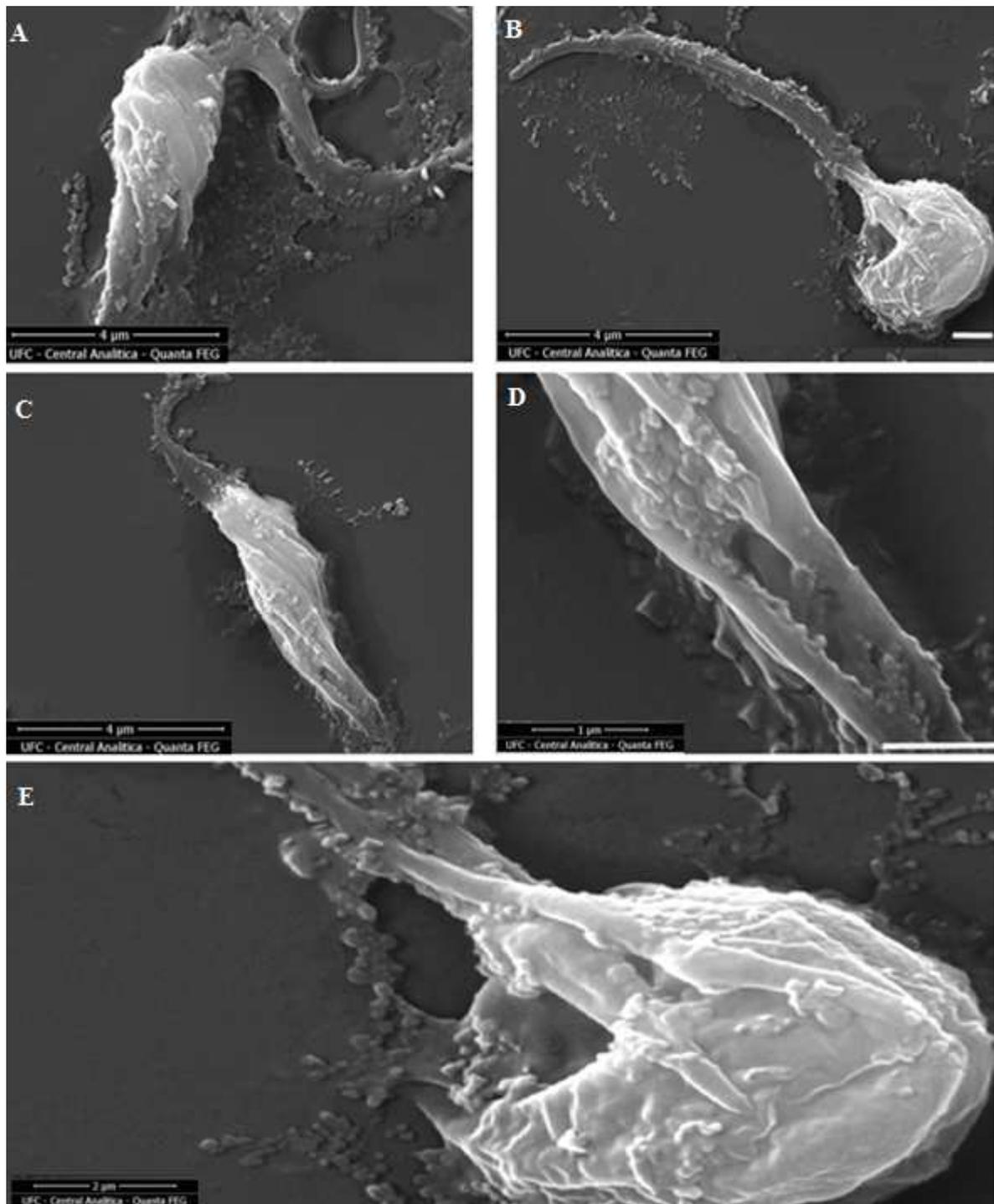
**Figura 33.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de *T.cruzi* não tratadas com batroxidina.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** Observam-se parasitos com comprimento adequado, corpos alongados típicos (A) e intactos morfológicamente (B). Barra de escala:4  $\mu$ m.

**Figura 34.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de *T.cruzi* após 24h de incubação com a batroxidina (11,3  $\mu$ M).



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Observa-se degeneração da cauda (A), modificação na parte superior do parasito (B) e formação de poro na membrana do parasito com extravasamento de material celular (C-E) após a incubação da Batroxidina (11,3 $\mu$ M) com formas epimastigotas de *T. cruzi* durante 24h. Barra de escala: 4,2 e 1  $\mu$ m.

# DISCUSSÃO

---

## 6. DISCUSSÃO

A Doença de Chagas é um problema de saúde pública e existe uma necessidade intermitente de se pesquisar novas alternativas terapêuticas para seu tratamento, visto que os dois fármacos disponíveis no mercado são eficazes principalmente no tratamento da fase aguda e apenas em 20% dos casos na fase crônica. Além disso, apresentam efeitos colaterais graves, sendo contraindicado para crianças e gestantes (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MORILLA; ROMERO, 2015; CHATELAIN, 2017). Logo, a identificação de novos agentes tripanocidas, assim como novos mecanismos de ação, com baixa citotoxicidade, amplo espectro de atividade são pontos críticos no desenvolvimento de agentes terapêuticos e estratégias de tratamento cada vez mais eficientes. Adicionalmente, existem poucos estudos com atividade antiparasitária de peptídeos antimicrobianos, principalmente quando comparados com o extenso arsenal de estudos com atividade antibacteriana.

Os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) exibem certas características que os tornam atraentes como alternativas aos fármacos convencionais, incluindo seu modo de ação rápido, baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência e capacidade de agir em conjunto com regimes de drogas existentes, alternativa conhecida como sinergismo; eles são comumente relacionados à sua alta especificidade contra estruturas do alvo microbiano, uma vez que estes são componentes naturais que exercem papel fundamental na imunidade inata, sendo menos propensos a induzirem resistência (ZASLOFF, 2002). Eles mostram um alto nível de toxicidade contra diversos microrganismos unicelulares, tais como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos, metazoários, outros parasitas, e até mesmo células cancerosas e vírus (HOSKIN E RAMAMOORTHY, 2008; ZASLOFF, 2002). Esses Peptídeos vêm sendo muito utilizados em pesquisas contra diversas doenças parasitárias, principalmente contra Doença de Chagas. McGwire e Kulkarni (2010) e Harrington (2011) identificaram alguns peptídeos antimicrobianos e derivados sintéticos que são ativos contra os cinetoplastos relacionados à *T. cruzi*, *Leishmania spp.* e tripanossomas africanos. Portanto, o estudo de seus respectivos mecanismos de ação é de fundamental importância no desenvolvimento e conhecimento de alvos farmacológicos.

Catelicidinas, peptídeo antimicrobiano presente na imunidade inata em de numerosos animais vertebrados (GAO *et al.*, 2015) foram identificadas nas bibliotecas de cDNA de glândula de veneno de espécies de serpentes de diversificados gêneros da América do Sul, incluindo *Crotalus durissus terrificus*, *C. d. Cascavella*, *Lachesis mutu muta*, *Bothrops atrox*

e *B. lutzi*. As sequências deduzidas destas catelicidinas de veneno de serpente foram denominadas viperidinas (RÁDIS-BAPTISTA, 2015). As Viperidinas, catelicidinas de venenos de glândula pitóide, demonstraram atividade antimicrobiana e anticancerosa (FALCÃO *et al.*, 2014; 2015; CAVALCANTE *et al.*, 2016). Recentemente a batroxidina, viperidina isolada da glândula da serpente *Bothrops atrox*, foi obtida e sintetizada, apresentando atividade antibacteriana contra uma grande variedade de cepas gram negativas e positivas (*S. pyogenes*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K.pneumoniae* e *P. aeruginosa*), com baixo potencial hemolítico, indicando sua possível utilidade como estruturas para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos (FALCAO *et al.*, 2014). Estudos com venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. atrox*, *B. jararaca* e *B. lutzi*) apresentaram atividade tripanocida (DEOLINDO *et al.*, 2010; De Melo *et al.*, 2011; DE MENEZES *et al.*, 2012).

A relevância desses PAMs viperidíneos, em conjunto com a atividade tripanocida apresentada por alguns venenos Botrópicos, motivaram a busca por uma potencial atividade da Batroxidina em cepa Y de *Trypanossoma cruzi*, bem como o índice de seletividade para o parasita e seu mecanismo de ação, comparando os resultados à droga de escolha disponível no mercado brasileiro para o tratamento da Doença de Chagas, o benzonidazol.

Dependendo da interação com o hospedeiro ou reservatório, *T. cruzi* pode assumir três formas morfológicas diferentes ao longo de seu ciclo de vida: epimastigota (fase proliferativa do inseto-vetor), tripomastigota (forma infecciosa, não-proliferativa) e amastigota (forma proliferativa intracelular) (ADADE *et al.*, 2012). Nesse trabalho, Batroxidina foi estudada nas três diferentes formas do ciclo evolutivo do parasito e apresentou efeito citotóxico para todas as formas.

O peptídeo Batroxidina (BatxC) apresentou atividade tripanocida tempo-dependente comparados ao BZ em formas epimastigotas. No tempo de 24h de tratamento as concentrações de IC<sub>50</sub> do Benzonidazol (218µM) foram bem maiores do que as do peptídeo testado (11,3µM). Para os tempos de 48h e 72h as IC<sub>50</sub> do BZ foram 10 e 2 vezes maiores do que as do BatxC, respectivamente.

Peptídeos isolados do veneno de serpentes, como a Crovirin, mostraram efeito semelhante, sendo efetivos contra as três formas evolutivas de *T. cruzi* e uma alta seletividade ao parasita (ADADE *et al.*, 2014). A descoberta deste peptídeo de efeito tripanocida foi

inspirada em estudos realizados com o veneno da serpente *Crotalus virides virides* contra *T. cruzi*, buscando-se o peptídeo responsável por essa ação (ADADE *et al.*, 2011).

As formas tripomastigotas e amastigotas foram obtidas por infecção de células LLC-MK2. Esta linhagem de células renais suporta uma elevada percentagem de células infectadas, índice de interiorização (parasitas/célula) e número de liberação de tripomastigotas (ZINGALES *et al.*, 1982; ANDREWS; COLLI, 1982). A Batroxidina demonstrou uma baixa toxicidade em células LLC-MK<sub>2</sub> e macrófagos murinos (RAW 264.7), considerando as concentrações usadas em linhagens celulares e comparando com os parasitos em cultivo.

Nos ensaios com a forma tripomastigota de *T. cruzi* (forma infectante não proliferativa), a BatxC exibiu efeito dose-dependente após 24 horas de incubação. A BatxC apresentou atividade nas concentrações de 0,18 µM até 1,56 µM, tendo uma melhor inibição dos parasitas na concentração de 1,56µM. A ação tripanocida de BatxC foi mais eficiente que a droga de referência Benzonidazol. Enquanto a IC<sub>50</sub> de BatxC foi de 0,44 µM para a forma tripomastigota, a do fármaco de referência foi de 282µM, demonstrando grande relevância em seu efeito tripanocida, uma vez que esta é a forma infectante em humanos.

Vários PAMs isoladas de insetos e mamíferos são ativos contra *T. cruzi* em ensaios in vivo. Homólogos sintéticos da Cecropina B, isolada do veneno do inseto *Hyalophora cecropia*, são tóxicos aos tripomastigotas de *T. cruzi*, além de ser ativo contra as formas intracelular dentro de células Vero, sem apresentar toxicidade à célula hospedeira (BARR *et al.*, 1995; JAYNES *et al.*, 1988). Dermaseptina, peptídeo antimicrobiano isolado da pele de anfíbios da subfamília Phyllomedusinae, também demonstraram atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, sem ser citotoxicidade em células de mamífero (BRAND *et al.*, 2002).

A fim de realizar uma análise estatística e ratificar esta comparação, foi calculado o índice de seletividade. O critério utilizado por WHO/TDR para substâncias promissoras contra o *T. cruzi* é um índice de seletividade maior que 50 (NWAKA; HUDSON, 2006). O índice de seletividade é calculado pela relação entre as IC<sub>50</sub> da célula-alvo e da célula hospedeira. Neste estudo, utilizamos os dados de concentração inibitória de 50% da cultura de tripomastigota e LLC-MK<sub>2</sub> para obtenção dos índices de seletividade de BatxC e BZ. BatxC apresentou índice de seletividade de 315, assim o valor apresentado encontra-se dentro do

critério da WHO/TDR, sendo bastante significativo comparando ao índice de seletividade do BZ de 2,18.

Outros peptídeos de venenos demonstraram seletividade contra *T. cruzi*, no entanto com índices de seletividade menores do que os encontrados para a BatxC. Estudos realizados como a Melitina, peptídeo obtido do veneno da abelha *Apis mellífera*, apresentou um índice de seletividade de 35 (ADADE *et al.*, 2013). Portanto, o cálculo de índice de seletividade permite justificar os trabalhos *in vitro* e as posteriores pesquisas translacionais.

No contexto da evolução clínica da doença de Chagas, ela é usualmente dividida em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, a parasitemia pode ser evidente, favorecendo o tratamento e, inclusive a obtenção de sucesso terapêutico utilizando os medicamentos convencionais (SESTI-COSTA *et al.*, 2014). Em contrapartida, a fase crônica consiste em um parasitismo tecidual no qual as formas amastigotas reproduzem-se por fissão binária no citoplasma de células do hospedeiro, sendo esta fase de mais difícil tratamento, uma vez que os fármacos existentes aprovados não são capazes de permearem significativamente a membrana plasmática (MORILLA; ROMERO, 2015). Portanto, um novo desafio surge com a busca de substâncias com uma citotoxicidade seletiva para as formas amastigotas.

Assim sendo, com a finalidade dar continuidade ao estudo da atividade antiparasitária da Batroxidina nos diferentes níveis do ciclo evolutivo do protozoário, foram realizados os ensaios em formas amastigotas (forma infectante e proliferativa). Os experimentos com a BatxC contra as formas intracelulares mostraram que houve uma redução no percentual de células infectadas, como também houve redução na porcentagem do número de amastigotas nas células. A Batroxidina foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas em 40-45%, e o percentual de formas amastigotas em 33% e 43,5% nas concentrações de 0,44 e 0,88  $\mu\text{M}$  após 24h de tratamento, enquanto BZ mostrou efeito em concentrações de 280 e 560  $\mu\text{M}$ , com diminuição de apenas 25% do percentual de células infectadas e na redução de 46% do número de amastigotas celulares. Em 48h de incubação, com as mesmas concentrações utilizadas, BatxC não foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas, no entanto reduziu o percentual em 23% e 33% ( $\text{IC}_{50}$  e  $2\times\text{IC}_{50}$ ), de formas amastigotas nas células hospedeiras. Esse resultado demonstra que a ação do peptídeo é tempo-dependente, e que induzir a morte dos parasitas pelo mecanismo necrose, possui uma rápida ação, obtendo melhores resultados em 24h de tratamento. No entanto, ainda apresenta resultados satisfatórios na diminuição do percentual de formas amastigotas.

A resistência das formas amastigotas intracelulares aos tratamentos tem sido reportada em alguns estudos como um resultado da dificuldade de certas drogas atravessarem a membrana da célula infectada e obter o acesso ao parasito dentro do vacúolo parasitóforo (BORGES *et al.*, 2012). Ainda neste contexto, protozoários amastigotas são descritos como células mais resistentes quando comparados com as formas promastigotas (formas extracelulares), uma vez que a superfície externa do glicocálix dos promastigotas é composta por lipofosfoglicano e proteofosfoglicano, sendo carregada negativamente e favorecendo a permeação de peptídeos (RAJA *et al.*, 2017). Destaca-se, portanto, a importância do resultado obtido, uma vez que os fármacos disponíveis são ineficazes no tratamento contra as formas amastigotas, confirmando a relevância do estudo destes peptídios no enriquecimento do arsenal terapêutico quimioterápico (MARIN-NETO *et al.*, 2009; URBINA; DOCAMPO, 2003).

Além de estudar o efeito tripanocida, neste trabalho também foi investigado o mecanismo de morte induzido por BatxC no parasito *T. cruzi* através de ensaios de citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura utilizando marcadores específicos. Na citometria de fluxo, os parasitos tratados com BatxC foram marcados com 7-AAD e Anexina e os resultados demonstraram que em 6 e 24 horas de tratamento houve um aumento significativo da população de parasitos marcado com a fluorescência proveniente do 7-AAD, nas duas concentrações estudadas ( $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$ ) indicando que houve lesão da membrana celular, visto que esse marcador não é permeável em membranas integras. Este resultado caracteriza um possível envolvimento necrótico no processo de morte induzido pelo peptídeo. Para confirmar esta hipótese, dois outros ensaios foram realizados por citometria em 6 e 24 horas. O ensaio utilizando Rodamina123, avaliando modificações no potencial transmembrânico mitocondrial e DCFH-DA, para a mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.

As características de morte por necrose em parasitos envolvem alterações nas mitocôndrias, incluindo a despolarização mitocondrial, repercutindo na depleção de ATP e consequente geração de EROs (radicais livres, como o  $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ), levando a dano redox e oxidação de lipídios de membranas. O metabolismo energético alterado contribuirá para o aumento da glicólise anaeróbica e diminuição das reservas de glicogênio, aumentando o ácido lático e fosfatos inorgânicos. Esse aumento de produção ácida causa diminuição do pH, prejudicando a atividade de muitas enzimas celulares. Adicionalmente, a deficiência na

bomba de cálcio, devido à falta de energia acarreta em desequilíbrio da homeostase do cálcio, através do aumento do cálcio intracitoplasmático, o que desemboca na ativação de muitas enzimas que levam a degradação celular, como as endonucleases e as proteases; a diminuição da síntese protéica resulta em danos às membranas mitocondriais e lisossomiais. Ocorre também a vacuolização citoplasmática através da disfunção da bomba de sódio e potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase), acumulando sódio intracelularmente e levando à perda de potássio para o meio externo, gerando edema celular e dilatação do retículo endoplasmático, desorganização do complexo de Golgi e, em última instância, a degradação da membrana plasmática (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009; MEIRA *et al.*, 2015).

A análise de Rho123 mostrou que ocorreu redução na fluorescência no grupo de parasitos tratados com a batroxicidina, condizente com alterações na membrana mitocondrial, uma vez que a Rho 123 só se acumula em mitocôndrias intactas livres de danos emitindo fluorescência vermelha. É comum a lesão mitocondrial resultar na formação de um canal de alta condutância na membrana mitocondrial, chamado de poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A abertura desse canal determina a perda do potencial de membrana da mitocôndria e alteração do pH, resultando em falha da fosforilação oxidativa e depleção progressiva do e ATP, culminando na necrose da célula (KUMAR *et al.*, 2013).

O aumento de EROs também pôde ser observado através da análise de fluorescência do DCFH-DA. Apesar do seu efeito citotóxico bem conhecido, o papel de EROs nestes protozoários é complexo, mas alterações mitocondriais parecem estar ligadas à produção desses radicais. Dependendo da concentração, estas espécies reativas poderiam causar morte dos parasitas, devido a uma diminuição na eficiência do metabolismo aeróbico (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Durante o processo respiratório, diversos agentes oxidantes que podem causar disfunção e perda de função mitocontrial são produzidos na mitocôndria de *T. cruzi* (PIACENZA *et al.*, 2009).

O *T. cruzi* possui variados mecanismos antioxidantes com o objetivo de resistir as EROs formadas durante a explosão respiratória, sobretudo nos macrófagos do hospedeiro, assegurando o seu potencial infectivo. Dentre os mecanismos detoxificantes existentes no parasito, destacam-se vias citoplasmáticas, enzimáticas extracelulares e, principalmente, as mitocondriais. Portanto, substâncias capazes de regular o stresse oxidativo nas células do parasito e, conseqüentemente, de despolarizar o potencial elétrico altamente negativo presente na membrana mitocondrial estão intimamente relacionadas com a disruptura da cadeia

transportadora de elétrons, gerando isquemia celular e, como principal consequência os fenômenos de morte celular, principalmente por vias necróticas, afirmações corroborantes aos achados do presente trabalho (PIACENZA *et al.*, 2009; GOES *et al.*, 2016).

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura com parasitos tratados com BatxC mostrou danos na ultraestrutura morfológica, tais como perda na integridade da membrana plasmática, retração de flagelos e formação de corpúsculos celulares, achados indicativos de dano necrótico, corroborando com os dados obtidos na citometria de fluxo com Anexina e 7-AAD, no quais houve uma marcação predominante por 7AAD (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009). Tudo isso, junto às alterações bioquímicas observadas nesse estudo, como alteração da integridade da membrana, alteração no potencial da membrana mitocondrial, aumento de EROS sugerem que BatxC induz morte por necrose em *T. cruzi*.

A indução de necrose em formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi observada em outros estudos utilizando venenos de serpentes e suas frações isoladas, onde achados como lesão de membrana celular com perdas de componentes citoplasmático e alteração do potencial da membrana mitocondrial também foram encontrados (DEOLINDO *et al.*, 2005; ADADE *et al.*, 2010; ADADE *et al.*, 2014).

As catelicidinas agem causando dano na membrana e junto a outros mecanismos gera a morte do parasito. Estudos realizados por McGwire *et al.* (2010) contra o *Trypanosoma brucei*, demonstraram atividade tripanocida de diferentes catalicidinas, através da ruptura da membrana celular. A catalicidina equina, eCATH1 também foi capaz de matar *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma equiperdum* causando permeabilização da membrana plasmática e alteração do potencial da membrana mitocondrial (CAUCHARD *et al.*, 2016).

Diferentes PAMs levam à morte celular ao induzir necrose, apoptose e até mesmo autofagia (BERA *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006, 2009a). A sequência de eventos que levam a diferentes modos de morte celular induzida por PAMs não é ainda inteiramente clara. Sendo necessário outros estudos para elucidar esses mecanismos que culminam em diferentes vias de morte celular.

Os resultados mostrados no presente trabalho fortalecem a teoria de que embora esteja bem estabelecido que os peptídeos antimicrobianos desestabilizem as membranas da

superfície celular, parece que também podem entrar nas células e associar-se às organelas intracelulares, dando origem a efeitos nas vias metabólica e bioenergética. Neste contexto, os dados de morte celular obtidos corroboram com a informação de que tripanossomídeos possuem uma única mitocôndria, a qual apresenta estrutura distinta daquelas das células de mamíferos, tornando esta organela um potencial alvo farmacológico, desde que haja permeabilidade de membrana (RAJA *et al.*, 2017).

Ainda no sentido de se investigar possíveis mecanismos de morte celular, a autofagia também foi investigada como via alternativa de indução de morte através da marcação com laranja de acridina em citometria de fluxo. Entretanto, não houve aumento significativo de fluorescência entre as células tratadas com BatxC e o controle negativo, indicando que não houve aumento do acúmulo do marcador em compartimentos ácidos que indicariam autofagia. Em contrapartida, a melitina, um peptídeo isolado do veneno da abelha *Apis mellifera* foi tem ação contra o parasito *Trypanossoma cruzi*, afetando as formas evolutivas do parasito e levando a múltiplos efeitos. Nas formas epimastigotas, foi observado à morte celular autofágica como principal mecanismo de morte. Em contraste, nas formas tripomastigotas o mecanismo apoptótico foi à via de morte celular programada encontrada (ADADE *et al.*, 2013).

Portanto, BatxC foi efetivo contra todas as formas de *T.cruzi*, apresentando um melhor resultados nas duas formas mais importantes (tripomastigota e amastigota) para tratamento da doença. O peptídeo possui alto índice de seletividade e inibiu formas amastigotas, com concentrações inferiores às necessárias para causar danos às células hospedeiras. Sendo uma substância com possível potencial terapêutico no tratamento sinérgico com benzonidazol, ou até mesmo no desenvolvimento de uma nova ferramenta terapêutica, com segurança superior ao atual fármaco de referência utilizado no tratamento da doença de chagas.

# CONCLUSÃO

---

## 7. CONCLUSÃO

O peptídeo Batroxidina apresenta efeito tripanocida sobre as três formas de *Trypanosoma cruzi*, sem apresentar toxicidade *in vitro* em células de mamífero. As alterações celulares que levam o parasito a morte, são indicativas de necrose, envolvendo lesão da membrana celular, dano mitocondrial e liberação de espécies reativas de oxigênio. Os resultados apresentados, demonstram que o BatxC é uma substância promissora no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas.

# REFERÊNCIAS

---

## 8. REFERÊNCIAS

ABE, F. et al. Trypanocidal Constituents in Plants 1 . Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco , Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol . Pharm. Bull**, v. 25, n. 9, p. 1188–1191, 2002.

ABRAMS, S.B; HALLETT, M. Clinical utility of different botulinum neurotoxin preparations. **Toxicon**. v.1(67): p.81-6, 2013.

ADADE C.M.; OLIVEIRA I.R.; PAIS J.A.;SOUTO-PADRÓN T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v.69: p.227-39, 2013.

ADADE CM, CONS BL, MELO PA, SOUTO-PADRÓN T. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. 138(1):46-58, 2011.

ADADE CM, CONS BL, MELO PA, SOUTO-PADRÓN T.Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. 138(1):46-58, 2010.

ADADE CM, OLIVEIRA IR, PAIS JA, SOUTO-PADRÓN T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways.**Toxicon**. 69:227-39, 2013.

ADADE, C.M.; CARVALHO, A.L.; TOMAZ, M.A.; COSTA, T.F.; GODINHO, J.L.; MELO, P.A.; LIMA, A.P., RODRIGUES, J.C.; ZINGALI, R.B.; SOUTO-PADRÓN, T. Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania.**PLoS Negl Trop Dis**. v.22; p.1817–28, 2014

ADADE, C.M.; CHAGAS, G.S.; SOUTO-PADRÓN, T. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. v.139(11): p.1444-61, 2012.

AKI, K.; IZUMI, A.; HOSOI E. The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. **J Med Invest.** v.59 (1-2): p.143-51, 2012.

ALVES, G.J.; VISMARI, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. **Neuroimmunomodulation.** v.14(6): p.297-303, 2007.

ALVES, M.J.; COLLI, W. Trypanosoma cruzi: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life;** v.59(4-5): p.274-279, 2007.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Rev. Saúde Pública** . vol.43, n.2, pp.381-382, 2009.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa,** v.1(1), p37-58, 2007.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers.** v.47(6): p.415-33, 1998.

ANDREWS NW, COLLI W. Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells. **J Protozool.** 29(2):264-9, 1982.

BARACCA, A.; SGARBI, G.; SOLAINI, G.; LENA Z, G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. **Biochim Biophys Acta.** v.1606(1-3): p.137-46, 2003.

BARR SC, ROSE D, JAYNES JM. Activity of lytic peptides against intracellular Trypanosoma cruzi amastigotes in vitro and parasitemias in mice. **J.Parasitol.** 81(6):974-8, 1995

BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides,** p. 403-414, 2006.

BERA, A.; SINGH, S.; NAGARAJ, R.; VAIDYA, T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Molecular & Biochemical Parasitology** v.127: p.23–35, 2003.

BIAGLOW, J.E.; VARNES, M.E.; ROIZEN-TOWLE, L. Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. **Biochem. Pharmacol.** v.35,p. 77–90, 1986.

BONFOCO, E.; CECCATELLI, S.; MANZO, L.; NICOTER, A. Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. **P.Exp Cell Res.** v.218(1): p.189-200, 1995.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many. **NIH Public Access.** v. 8, n. 6, p. 510–518, 2010.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.

BRAND GD, LEITE JR, SILVA LP, ALBUQUERQUE S, PRATES MV, AZEVEDO RB, CARREGARO V, SILVA JS, SÁ VC, BRANDÃO RA, BLOCH C JR. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **J Biol Chem.** 277(51):49332-40, 2002.

BRANDENBURG, L.O.; VAROGA, D.; NICOLAEVA, N.; LEIB, S.L.; WILMS, H.; PODSCHUN R C.J.; SCHRÖDER, J.M.; PUFE, T.; LUCIUS, R. Role of glial cells in the functional expression of LL-37/rat cathelin-related antimicrobial peptide in meningitis. **J Neuropathol Exp Neurol.** v.67(11): p.1041-54, 2008.

BRANQUINHO, R.T.; MOSQUEIRA, V.C.; DE OLIVEIRA-SILVA, J.C.; SIMÕES-SILVA, M.R.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; DE LANA, M. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. **Antimicrob Agents Chemother.** v.58(4): p.2067-75, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. **Doença de Chagas.** 2012.

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

BRUSSELAERS, N.; VOGELAERS, D.; BLOT, S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. **Ann Intensive Care**. v.1: p. 47, 2011.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop**. v. 44, n.1, p. 29-37, 2002.

CASTRO D.P.; SEABRA S.H.; GARCIA E.S.; DE SOUZA W. ; AZAMBUJA P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Exp Parasitol.**;v. 117(2): p.201-207, 2007.

CAUCHARD S, VAN REET N, BÜSCHER P, GOUX D, GRÖTZINGER J, LEIPPE M, CATTOIR V, LAUGIER C, CAUCHARD J. Killing of Trypanozoon Parasites by the Equine Cathelicidin eCATH1. **Antimicrob Agents Chemother**. 60(5):2610-9, 2016.

CAVALCANTE, C.S.P. *et al.* Anti-fungal activity of Ctn [15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. **The Journal of Antibiotics**. v.127: p.23–35, 2016.

CHAGAS, C. Nova Trypanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schistosoma cruzi*, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, 1(2): p.159-218, 1909.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. v. 15, p. 98-103, 2017.

COLE, A.M.; LEHRER, R.I. Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis **Curr Pharm Des**. v.9(18): p.1463-73, 2003.

COURA, J. R. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 113–122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5–13, 2012.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v.465, p.S6–S7, 2010.

CRUCHTEN, S. V.; BROECK, W. V. D. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat Histol Embryol**, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nature medicine**, v. 5, p. 1110-1113, 1999.

DE MELO, R.; DE FREITAS, R.; ANTONUCCI GA,H. ; DE LOURDES, M.; RODRIGUES, K.C.; LUCARINI R, R.C.; LINHARI, R.C.; GOMES, C.H.; DE ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S.V. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie** v.93(5): p.941-7, 2011.

DE MENEZES, R.R.; TORRES, A.F.; DA SILVA, T.S.; DE SOUSA, D.F.; LIMA D.B.; NORJOSA, D.B.; NOGUEIRA,N.A.; OLIVEIRA M.F.; DE OLIVEIRA, M.R.; MONTEIRO, H.S.; MARTINS, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzi* venom. **Nat Prod Commun**. v.7(1): p.71-4, 2012.

DE SOUZA W. ; DE CARVALHO T.M.; BARRIAS E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**. v.363(3): p.828-34, 2010.

DEOLINDO P, TEIXEIRA-FERREIRA AS, DAMATTA RA, ALVES EW. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Toxicon*. 56(6):944-55, 2010.

DEOLINDO, P. *et al.* Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 33-38, 2005.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v.32(9), p.2444-2457, 2009.

DNDi. Doença de Chagas.Estratégia da DNDi[Internet]. 2015. Disponível em:<http://www.dndial.org/pt/doencasnegligenciadas/doencadechagas/estrategiadadndi.html> Acesso em: 26 nov 2016

DYPBUKT, J.M.; ANKARCORONA, M.; BURKITT, M.; SJÖHOLM, A.; STRÖM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.J. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **Biol Chem**. v.269(48): p.30553-60,1994.

FALCAO, C. B.; DE LA TORRE, B.G.; PÉREZ-PEINADO, C.; BARRON, A.E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino acids**. v. 46, n. 11, p. 2561-2571, 2014.

FALCÃO, C. B.; PÉREZ-PEINADO, C.; DE LA TORRE, B.G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H.; JIMÉNEZ, M.Á.; RÁDIS-BAPTISTA, G., ANDREU, D. Structural dissection of crotalicidin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with antimicrobial and antitumor activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 21, p. 8553-8563, 2015.

FERREIRA, S. H. A. Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 24, p. 163-169, 1965.

GAO, W.; XING, L.; QU, P.; TAN, T.; YANG, N.; LI, D.; CHEN, H.; FENG, X.; Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism. **Sci Rep** v.26, p.160-72, 2015.

GASCON J; BERN C.; PINAZO M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop.**, v.115(1-2): p.22-7, 2010.

GOES GR1, ROCHA PS1, DINIZ AR1, AGUIAR PH1, MACHADO CR1, VIEIRA LQ1. Trypanosoma cruzi Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS Negl Trop Dis.** v.10(4):e0004555, 2016.

GONCALVES, A. R. *et al.* Ultrastructural alterations and growth inhibition of Trypanosoma cruzi and Leishmania major induced by Bothrops jararaca venom. **Parasitology research**, v. 88 (7): p. 598-602, 2002.

GUERRA-NETO, Pedro Gonçalves da Silva. Toxina Butolínica tipo A: Ações farmacológicas e riscos de uso nos procedimentos estéticos faciais. 116 paginas. Universidade Federal de Pernambuco. **Tese de doutorado.** Recife, 2016.

GUIMARÃES, .C; LINDEN, R.; ZIEGLER, U .; GROSCURTH P. Morphological features of cell death. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **News Eur J Biochem. Physiol Sci.** v.19: p.124-82-84, 2004.

HALL, B.S.; WILKINSON, S.R. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.56, p.115–123, 2012.

HARRINGTON, J.M. Antimicrobial peptide killing of African trypanosomes. **Parasite Immunol.** v.33(8): p.461-9, 2011.

HARVEY, A.L. Toxins and drug discovery. **Toxicon.** v. 92, p. 193-200, 2014.

HASSLOCHER-MORENO A.M.; DO BRASIL P.E.; DE SOUSA A.S.; XAVIER S.S.; CHAMBELA M.C.; SPERANDIO DA SILVA G.M.J. Safety of benzimidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Antimicrob Chemother.** v.67(5):p.1261-6, 2012.

HERNÁNDEZ-CHINEA, C.; CARBAJO, E.; SOJO, F.; ARVELO, F.; KOUZNETSOV, V.V.; ROMERO-BOHÓRQUEZ, A.R.; ROMERO, P.J. In vitro activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-c]quinolines on Leishmania mexicana. **Parasitol Int.** v.64(6): p.479-83, 2015.

HIGINO, T. M. M. Novas perspectivas de fármacos com propriedade tripanocida: estudos biológicos de compostos heterocíclicos. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife: 84 p., 2012.

HOSKIN, D.W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**. v.1778(2): p.357-75, 2008.

JAYNES J.M; BARR S.B; BURTON CA; JEFFERS G.W; JULIAN G.R; WHITE K.L; ENRIGHT F.M; KLEI TR; LAINE R.A. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi. **FASEB J**. 2(13):2878-83, 1988.

JOY S.V; RODGERS P.T.; SCATES A.C. Incretin mimetics as emerging treatments for type 2 diabetes. **Ann Pharmacother**. v.39(1): p.110-8, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P., GREEN, D.R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**.v.16(1): p.3-11, 2009.

KRYSKO, D.V. et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Science Direct**, v. 44, p. 205–221, 2008.

KULKARNI, M.M.; MCMASTER, W.R.; KAMYSZ, W.; MCGWIRE, B.S.; Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of Leishmania results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. **Journal of Biological Chemistry** v.284:p.15496–15504, 2009a.

KULKARNI, M.M.; OLSON, C.L.; ENGMAN, D.M.; MCGWIRE, B.S. Trypanosoma cruzi GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. **Infection & Immunity** v.77: p. 2193–2200, 2009b.

KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 45–51, 2013.

LESCURE F.X.; LE LOUP G.; FREILIJ H.; DEVELOUX M.; PARIS L.; BRUTUS L.; PIALOUX G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis.** v.10 (8): p.556–570, 2010.

LESLIE M. Drug Developers Finally Talk Aim At a Neglected Disease. **Science**, v. v.333, 2011.

LIMA, D.B.; SOUSA, P.L.; TORRES, A.F.; RODRIGUES, K.A; MELLO, C.P.; MENEZES, R.R.; TESSAROLO, L.D.; QUINET, Y.P.; DE OLIVEIRA, M.R. MARTINS, A.M. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon.** v.120: p.128-32, 2016.

LIMA-COSTA MF, MATOS DL, RIBEIRO AL. STROKE. Chagas disease predicts 10-year stroke mortality in community-dwelling elderly: the Bambui cohort study of aging. **Int J Cell Biol.** v.41(11):p. 2477-82, 2010.

LUNA, K.P.; HERNÁNDEZ, I.P.; RUEDA, C.M.; ZORRO, M.M.; CROFT, S.L.; ESCOBAR, P. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomedica.** v.29(3): p.448-55, 2010.

LUQUE-ORTEGA, J.R.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.; SAUGAR, J.M.; RIVAS, L. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. **FASEB Journal** v.22: p. 1817–1828, 2008.

MACHADO-DE-ASSIS G.F.; DINIZ GA, MONTOYA R.A.; DIAS J.C.; COURA J.R.; MACHADO-COELHO G.L.; ALBAJAR-VIÑAS P.; TORRES R.M.; LANA M.D. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after Intervention. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 108(7): p.873-80, 2013.

MARIN-NETO J.A.; CUNHA-NETO E.; MACIEL B.C.; SIMÕES M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115(9): p.1109–1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial : testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. June, p. 319–324, 2009.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, A.; AVEZUM JR, A.; MATTOS, A.C.; RASSI, A.; MARÓTI, G.; KONDOROSI, E.; KERESZT, A.; MERGAERT, P. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. **Curr Opin Microbiol**. v.14(1): p.76-81,2011.

MATAK, I.; LACKOVIĆ, Z. Botulinum toxin A, brain and pain. **Prog Neurobiol**. v.19(12): p.39-59, 2014.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A., MORELLO A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. v.146(4):p.601-20, 2007.

MCGWIRE, B.S.; KULKARNI, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental parasitology**. v. 126, n. 3, p. 397-405, 2010.

MCMULLAN, D. "Scanning electron microscopy 1928–1965". **Scanning**. v.17 (3):

MEIRA, C.S.; GUIMARÃES, E.T.; DOS SANTOS, J.A.; MOREIRA, D.R.; NOGUEIRA, R.C.; TOMASSINI, T.C.; RIBEIRO, I.M.; DE SOUZA, C.V.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; SOARES, M.B. In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**. v.22(11): p.969-74, 2015.

MENEZES, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra. Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 in vitro. 201f. : il. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de PósGraduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L.. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed research international** , 2014.

MENNA-BARRETO, R.F.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; SANTA-RITA, R.M.; SOARES, M.J.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**. v.40(2): p.157-68, 2009.

MORENO, M.; D'ÁVILA, D.A.; SILVA, M.N.; GALVÃO, L.M.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; GONTIJO, E.D.; ZINGALES B. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.105(7): p.918-24, 2010.

MORILLA, M.J; ROMERO, E.L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**. v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

MORILLO, C.A.; SOSA-ESTANI, S.; YUSUF, S. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, Supl. 1, p.319–324, 2009.

MUÑOS-SARAIVA, S.G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: From pathogenesis to treatment regimes. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*, vol.16, p. 55-81, 2012.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941-955, 2006.

PEREIRA K.S.; SCHMIDT F.L.; GUARALDO A.M.; FRANCO R.M.; DIAS V.L.; PASSOS L.A. J. Chagas' disease as a foodborne illness. **Food Prot.**,v.72(2): p.441-6, 2009.

PEREIRA P.C.; NAVARRO E.C.J.Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. v.19 (1): p.34, 2013.

PEREIRA, Ticiano Praciano. Efeito tripanocida da l-amino ácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* – 2015. 81 f. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2015.

PÉREZ -AYALA A.; PÉREZ-MOLINA J.A.; NORMAN F.; NAVARRO M.; MONGE-MAILLO B.; DÍAZ-MENÉNDEZ M.; PERIS-GARCÍA J.; FLORES M.; CAÑAVATE C.; LÓPEZ-VÉLEZ R. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clin Microbiol Infect.** v.17(7): p.1108-13, 2011.

PEREZ, A. P. et al. Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3335–3345, 2014.

PIACENZA, L. et al. Fighting the oxidative assault : the Trypanosoma cruzi journey to infection a Noel Alvarez , Gonzalo Peluffo and Rafael Radi. **Science Direct**, v. 12, p. 415–421, 2009.

PITA, S. S.R.; PASCUTTI, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotona Redutase como Foco. **Rev. Virtual Quim.** v.3 (4): p.307-324, 2011.

POPE, J.E.; DEER, T.R. Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. **Expert Opin Pharmacother.** 14(7):957-66, 2013.

RÁDIS-BAPTISTA, G. Viperidins, Snake Venom Cathelicidin-Related Peptides, in the Milieu of Reptilian. **Antimicrobial Polypeptides.**2015

RASSI, JR., A; MARIN-NETO, J.A..Chagas disease. **The Lancet**, Volume 375, p. 1388-1402, 2010.

RIBEIRO I. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. **PLoS Negl Trop Dis.** v.3(7):p.484, 2009.

RODRIGUES, J.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A.G.; SANGI, D.P.; NAKAMURA, C.V. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against Trypanosoma cruzi. **PLoS One.** v.9(1): e85706., 2014.

ROMANHA A.J.;CASTRO S.L.; SOEIRO, M.N.C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L.I.; BAHIA, M.T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z.A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105(2) p. 233-238, 2010.

SAGGIA, M. G.; SANTOS, E. A. V.; DIETZE, R. Custo-efe-tividade de benzonidazol para a doença de Chagas no Brasil. **In: VIII Encontro ABRES**, São Paulo, 2007.

SANDES, A.F.; DE LOURDES CHAUFFAILLE, M.; OLIVEIRA, C.R.; MAEKAWA, Y.; TAMASHIRO, N.; TAKAO, T.T.; RITTER, E.C.; RIZZATTI, E.G. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. **Cytometry B Clin Cytom.** v.86(2) p.98-105,2014.

SCALISE, M.L.; ARRÚA, E.C.; RIAL, M.S.; ESTEVA, M.I.; SALOMON, C.J.; FICHERA, L.E. Promising Efficacy of Benznidazole Nanoparticles in Acute Trypanosoma cruzi Murine Model: In-Vitro and In-Vivo Studies. **Am J Trop Med Hyg.** v.95(2): p.388-93, 2016.

SESTI-COSTA R, CARNEIRO ZA, SILVA MC, SANTOS M, SILVA GK, MILANEZI C, DA SILVA RS, SILVA JS. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.** 8(10):e3207, 2014.

SILVA A.L.; GIACOMIN R.T.; QUIRINO V.A.; MIRANDA E.S.A classification for chagasic megalocoon through contrast enema. **Rev Col Bras Cir.**v.30(1): p.4–10,2003

SILVA C.F.; MEUSER M.B.; DE SOUZA E.M.; MEIRELLES M.N.; STEPHENS C.E.; SOM P.; BOYKIN D.W.; SOEIRO M.N. Cellular effects of reversed amidines on Trypanosoma cruzi . **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51(11): p.3803-9, 2007.

SILVA, A.L.; ADADE, C.M.; SHOYAMA, F.M.; NETO, C.P.; PADRÓN, T.S.; DE ALMEIDA, M.V.; REZENDE, C.A.; SILVA, C.V.; SOUZA, M.A. In vitro leishmanicidal activity of N-dodecyl-1,2-ethanediamine. **Biomed Pharmacother.** v.66(3): p.180-6, 2012.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p. 442-448, 2012

STEWART, J.M.; FERREIRA, S.H.; GREENE, L.J. Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. **Biochem Pharmacol.** v.20(7): p.1557-67, 1971.

TEIXEIRA, V.; FEIO, Maria J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research.** v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012.

TEMPONE, A.G.; ANDRADE, H.F. J.R.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R. Bothrops moojeni venom kills Leishmania spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **N.Biochem Biophys Res Commun.** v.280(3): p.620-4, 2001.

TORRENT, M.; PULIDO, D.; VALLE, J.; NOGUÉS, M.V.; ANDREU, D.; BOIX, E. Ribonucleases as a host-defence family: evidence of evolutionarily conserved antimicrobial activity at the N-terminus. **Biochem J.** v.456(1): p.99-108, 2013.

TORRES, A.F.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F.J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M.G.; PINTO NOGUEIRA, N.A; ROSA DE OLIVEIRA, M.; TOYAMA, D., MONTEIRO, H.S.; MARTINS, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of Bothrops marajoensis venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon.** v.1;55(4): p.795-804, 2010.

TORRES, F.S.; SILVA, C.N.; LANZA, L.F.; SANTOS A.V.; PIMENTA, A.M.; DE LIMA, M.E.; DINIZ, M.R. Functional expression of a recombinant toxin - rPnTx2-6 - active in erectile function in rat. **Toxicon.** v.56(7): p.1172-80, 2010.

TOSSI, A.; SANDRI, L. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. **Curr Pharm Des.** v.8(9): p.743-61, 2002.

UNCITI-BROCETA, J.D.; CANO-CORTÉS, V.; ALTEA-MANZANO, P.; PERNAGALLO, S.; DÍAZ-MOCHÓN, J.J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, R.M. Number of Nanoparticles per Cell through a Spectrophotometric Method - A key parameter to Assess Nanoparticle-based Cellular Assays. **Sci Rep.** v.5:10091, 2015.

URBINA JA, DOCAMPO R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.** 19(11):495-501, 2003.

VANDEN BERGHE, T.; GROOTJANS, S.; GOOSSENS, V.; DONDELINGER, Y.; KRYSKO, D.V.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods.** v.61(2): p.117-29, 2013.

VOLPATO, H.; DESOTI, V.C.; VALDEZ, R.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA SDE, O.; SARRAGIOTTO, M.H.; NAKAMURA, C.V. Mitochondrial Dysfunction Induced by N-Butyl-1-(4-Dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -Carboline-3-Carboxamide Is Required for Cell Death of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One.** v.10(6):e0130652, 2015.

WARDMAN, P. Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine. **Environ. Health Perspect.** v.64, p.309–320,1985.

WEI, L. et al. Identification and Characterization of the First Cathelicidin from Sea Snakes with Potent Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity and Special Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16633-16652, 2015.

WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.** v.314, p.284–290, 1994.

World Health Organization (WHO). “Chagas disease (American trypanosomiasis)”. **Fact sheet N° 340 Updated March 2016.** World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2016.

World Health Organization (WHO). “Chagas disease (American trypanosomiasis)”. Fact sheet N° 340 Updated March 2016. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2016.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. **J Pathol.** v.271(9): p.1638-50, 1972.

ZASLOFF, M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. **Lancet.** 360(9340): 1116-7,2012.

ZHU, S., GAO, B. Evolutionary origin of  $\beta$ -defensins. **Dev Comp Immunol.** v.39(1-2): p.79-84,2004.

ZINGALES B, ANDREWS NW, KUWAJIMA VY, COLLI W. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. **Mol Biochem Parasitol.** 6(2):111-24, 1982.

# APÊNDICE

---

## APÊNDICE A

**Tabela 3.** Efeito da Batroxidina em *Trypanosoma cruzi* e células de mamífero.

	Epimastigote ( <i>T. cruzi</i> )		Trypomastigote ( <i>T. cruzi</i> )		LLC-MK2	
	BatxC	Bz	BatxC	Bz	BatxC	Bz
24 h	11.3±1.6	218±15	0.44±0.05 (315.5)	282±20 (2.18)	138.8±20	614.8±30
48 h	6.33 ±1.7	61.1±3	nd	nd	nd	nd
72 h	9.6 ±3.5	16.5±1	nd	nd	nd	nd

**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Legenda:** As formas epimatigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram quantificadas por contagem em câmara de Neubauer e as células LLC-MK2 foram quantificadas por ensaio de MTT. Os valores Índice de Seletividade foram expressos entre parênteses. Os valores de IC<sub>50</sub> expressos em µM. Os dados são expressos como médias ± SEM De 3 experimentos independentes.

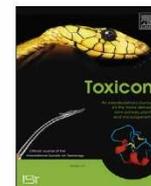
## APÊNDICE B

Toxicon 130 (2017) 56–62



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland



Clarissa Perdigão Mello<sup>a</sup>, Danya Bandeira Lima<sup>a</sup>,  
 Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes<sup>b</sup>, Izabel Cristina Justino Bandeira<sup>a</sup>,  
 Louise Donadello Tessarolo<sup>a</sup>, Tiago Lima Sampaio<sup>b</sup>, Claudio Borges Falcão<sup>a</sup>,  
 Gandhi Rádís-Baptista<sup>c</sup>, Alice Maria Costa Martins<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 January 2017

Received in revised form

23 February 2017

Accepted 24 February 2017

Available online 27 February 2017

## Keywords:

Batroxicidin

*Trypanosoma cruzi*

Chagas' disease

Necrosis

Cathelicidin

Antimicrobial peptide

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are potential alternatives to conventional antibiotics, as they have a fast mode of action, a low likelihood of resistance development and can act in conjunction with existing drug regimens. We report in this study the effects of batroxicidin (BtxC), a cathelicidin-related AMP from *Bothrops atrox* venom gland, over *Trypanosoma cruzi*, a protozoan that causes Chagas' disease. BtxC inhibited all *T. cruzi* (Y strain: benznidazole-resistant) developmental forms, with selectivity index of 315. Later, separate flow cytometry assays showed *T. cruzi* cell labeling by 7-aminoactinomycin D, the increase in reactive oxygen species and the loss of mitochondrial membrane potential when the parasite was treated with BtxC, which are indication of necrosis. *T. cruzi* cell death pathway by a necrotic mechanism was finally confirmed by scanning electron microscopy which observed loss of cell membrane integrity. In conclusion, BtxC was able to inhibit *T. cruzi*, with high selectivity index, by inducing necrosis.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chagas' disease also known as American trypanosomiasis is one of the world's 13 neglected diseases. According to the World Health Organization an estimated 10 million people are infected worldwide and more than 28 million are at risk of the disease. The causative agent is the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by a triatomine insect (Volpato et al., 2015; WHO, 2016).

The current available drugs to treat Chagas' disease, nifurtimox and benznidazole, are only effective in the acute phase, but fails to eradicate the intracellular form of parasites in chronic phase (Morilla and Romero, 2015). Furthermore, these medicines causes undesirable adverse effects in up to 40% of patients, which include nausea, vomiting, abdominal pain and several neurological effects (Marin-Neto et al., 2009).

The search for new molecules with potential anti-*T. cruzi* activity has been intensified in the field of natural products, with a special emphasis on selective polypeptides from animal venoms. These venom polypeptides and their fractions have stimulated many studies for drug discovery, with some notable successes (Harvey, 2014). A specific group of molecules derived from such venoms with potential anti-protozoa activities comprises the so-called antimicrobial peptides (AMPs), which have shown activity not only against *T. cruzi* but also against African trypanosomes and *Leishmania* spp. Also named host defense peptides, they are amphipathic molecules mainly composed of positively charged (hydrophilic) and hydrophobic residues, which can interact with and disrupt parasite cell membranes (McGwire and Kulkarni, 2010; Teixeira et al., 2012). An important class of these AMPs regards to the cathelicidins, which are found as multi-effector molecules of the innate immunity in numerous vertebrate animals. All cathelicidins share in common a conserved N-terminal preproregion composed of the signal peptide and the cathelin, cathepsin L inhibitor, domain and a variable C-terminal region which contains the mature sequence responsible for the antimicrobial activity (Gao

\* Corresponding author.

E-mail address: [martinsalice@gmail.com](mailto:martinsalice@gmail.com) (A.M.C. Martins).

et al., 2015).

Recently, our research groups have found and characterized cathelicidin precursors from the venom gland cDNA libraries of several species of South American pit viper snakes, including *Crotalus durissus terrificus*, *C.d. cascavella*, *Lachesis muta muta*, *Bothrops atrox* and *B. lutzii*; the deduced mature sequences of these snake venom cathelicidins were collectively named vipericidins (Rádis-Baptista, 2015). Batroxicidin, vipericidin from *B. atrox*, was obtained and it shows good antibacterial activity, especially against Gram-negative species (Falcão et al., 2014).

In this study, we have evaluated the anti-parasitic effect of batroxicidin, focusing on its potential activity against *T. cruzi*. This aim was pursued by verifying the cathelicidin-related peptide trypanocidal activity against all protozoan morphological forms. Additionally, the main mechanism that trigger *T. cruzi* cell death was also investigated followed of the treatment with batroxicidin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and cells

Batroxicidin (BatxC) (KRFKFKFKKLNKNSVKKRKKFRKPRVIGVTFPF-amide; MW = 4258.63 g/mol) was obtained as described by Falcão et al. (2014). The peptide stock solutions were prepared at 1000  $\mu$ M with deionized water as required and kept at 4 °C for up to six weeks. Beznidazole (Bz) (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>; MW = 260.249 g/mol) was obtained from Roche® (Basileia, Switzerland) and stock solutions were prepared at 1000 mM with PBS and kept at 4 °C for up to six weeks. The Rhesus monkey kidney cells LLC-MK2 (ATCC CCL-7) were cultured in DMEM medium (Vitrocell, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics solution in T-25/75 cm<sup>2</sup> flasks maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. These cells were split each time they reached 80–90% confluence after being harvested with a solution containing 0.25% trypsin and 2.21 mM EDTA. *Trypanosoma cruzi* Y (benznidazole-resistant) strain were isolated in Laboratory of parasites Biochemistry, University of São Paulo (São Paulo – Brasil) and donated in epimastigote and trypomastigote forms.

### 2.2. Batroxicidin activity assay against *T. cruzi* epimastigote forms

Epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain were added to 96-well plates (10<sup>6</sup> parasites/mL) containing 2-fold serial dilutions of BatxC or Bz in Liver Infusion Tryptose medium supplemented with 1% antibiotics and 10% of FBS. Final concentration ranges were: 0.19–100  $\mu$ M of BatxC and 15.6–1000  $\mu$ M of Bz. Parasites growth inhibition was quantified in a Neubauer chamber after incubation at 28 °C for 24, 48 and 72 h (Rodrigues et al., 2014). Relative viability was determined with parasites treated with only sterile PBS in medium as negative controls (100% viability) and experiments carried out in triplicate.

### 2.3. Batroxicidin activity assay against *T. cruzi* trypomastigote forms

The trypomastigote forms of *T. cruzi* were obtained by infecting of LLCMK2 cells with the protozoa (trypomastigote) in T-25/75 cm<sup>2</sup> flasks at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium (Vitrocell, São Paulo, Brazil) supplemented with 1% antibiotics and 2% FBS for 24 h. After that time trypomastigote forms were seeded in 96 well plates and 2-fold serial dilutions of either BatxC or Bz in DMEM were added at the same final concentrations ranges of BatxC and Bz used against the epimastigote forms. After 24 h incubation at 37 °C, parasite growth inhibition was quantified in a Neubauer chamber (Adade

et al., 2014). Relative cell viability was calculated with cells treated with only sterile PBS in medium as negative controls and experiments were carried out in triplicate.

### 2.4. BatxC cytotoxicity evaluation toward LLC-MK2 cells

Cell viability was also measured using a standard MTT assay (Vanden Berghe et al., 2013). LLC-MK2 cells were plated in the DMEM medium, treated with different concentrations of BatxC and incubated at 37 °C for 24 h. MTT (Amresco, Ohio, USA; 5 mg/mL) was added and the cells were incubated for 4 h, when 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS; Vetec, São Paulo, Brazil) was added to solubilize the formazan product. Cell viability measurements were performed at 570 nm on a microplate reader (Biochrom® Asys Expert Plus). Relative cell viability was calculated with cells treated with only sterile PBS in medium as negative controls and experiments were carried out in triplicate. The Selectivity index (SI) was calculated by the ratio of cytotoxic/trypanocidal activity (Nwaka and Hudson, 2006).

### 2.5. Batroxicidin activity assay against *T. cruzi* amastigote forms

LLC-MK2 cells were seeded in 24-well plates (5 × 10<sup>5</sup>/well) containing at the bottom glass coverslips (13-mm diameter) and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics, at 37 °C, in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, for 24 h. Next, the media was removed from the wells and LLC-MK2 cells were infected with trypomastigote forms (parasite: host cell ratio of 20:1) in DMEM medium containing 2% FBS. After 48 h of incubation, the cells were washed to remove the non-internalized parasites and treated with either BatxC (0.44 or 0.88  $\mu$ M) or Bz (282 or 564  $\mu$ M) in DMEM medium with 2% FBS. After incubation for 24 or 48 h at 37 °C, the coverslips were collected, washed with PBS, fixed in Bouin's solution and stained with Giemsa (Lima et al., 2016). Infected LLC-MK2 not treated with either Bz and BatxC peptide cells were used as controls and the number of intracellular amastigotes per 100 cells was counted in triplicates.

### 2.6. *T. cruzi* epimastigote death pathway assays

Experiments of flow cytometry were performed to investigate and evaluate the pathways by which BatxC induces *T. cruzi* death. The epimastigote forms were treated with BatxC at their respective IC<sub>50</sub> and 2x IC<sub>50</sub> concentrations (11.3 and 22.6  $\mu$ M) in Liver Infusion Tryptose medium. After incubation for 6 and 24 h at 28 °C, the parasite cells were washed and stained with FITC-annexin V (Ax) and/or 7-AAD according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, California, USA) to evaluate cell death by apoptosis or necrosis. In separate experiments, the mitochondrial transmembrane potential, the reactive oxygen species (ROS) and the swelling of reservosomes were also assessed. After treatment of *T. cruzi* epimastigote forms with BatxC at its IC<sub>50</sub> (11.3  $\mu$ M) for 6 and 24 h at 28 °C, the parasites were stained with 10  $\mu$ g/mL Rhodamine 123 or 20 mMol/L DCFH-DA or 5  $\mu$ g/mL Acridine Orange (Sigma – Aldrich™, St. Louis, MO), according to the manufacturer's instructions, respectively. Next, these parasite samples were run in a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA), in which 10,000 live events were collected and analyzed by means of the Cell Quest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Epimastigotes without BatxC treatment were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

### 2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Epimastigote forms were treated with BatxC peptide at its IC<sub>50</sub>

(11.3  $\mu\text{M}$ ) concentration in Liver Infusion Tryptose medium. After incubation for 24 h at 28 °C, the parasites were washed with PBS and fixed with a 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) solution. After fixation for 2 h at Room Temperature, parasites were washed with PBS, and then dehydrated with ethanol. Next, samples were dried with  $\text{CO}_2$ , coated with gold and, finally, observed in a FEG Quanta 450 scanning electron microscope (FEI, Oregon, USA). Digital images were acquired with its respective software and stored (Lima et al., 2016).

### 2.8. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{LC}_{50}$  values were determined by nonlinear regression. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. Significance was defined as  $*p < 0.05$ .

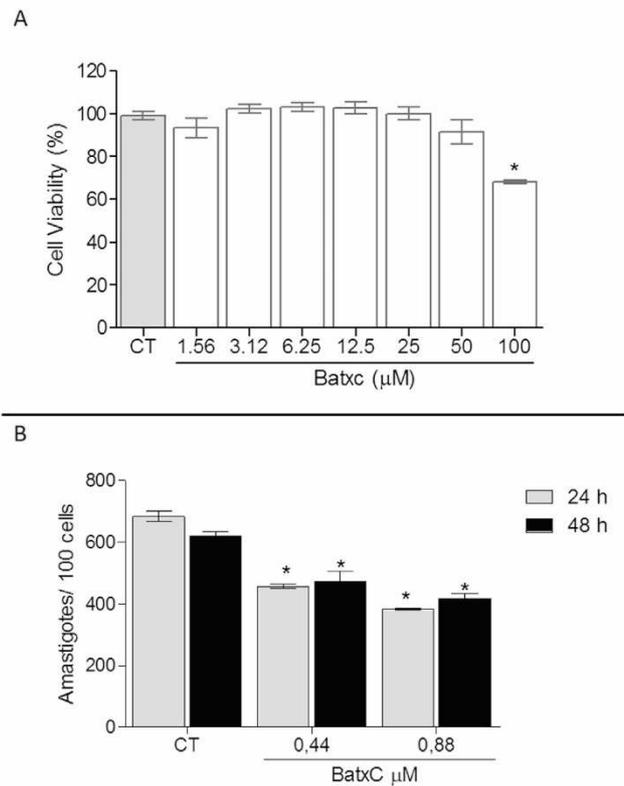
### 3. Results

BatxC peptide was tested against all three morphological forms of *T. cruzi* to evaluate the antichagasic activity and compare its effect with commercially available drugs, such as Bz. The concentrations of BatxC and Bz to inhibit 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) of epimastigotes and trypomastigotes after different time of incubation are presented in Table 1.

*T. cruzi* trypomastigote forms were also susceptible to BatxC treatment with an  $\text{IC}_{50}$  as low as 0.44  $\mu\text{M}$  while Bz needed 282  $\mu\text{M}$  to kill 50% of the these parasite life forms after 24 h of incubation. We also tested the peptide cytotoxicity with uninfected LLC-MK2 cells to ascertain the BatxC selective activity against the *T. cruzi*. According to Fig. 1A, the peptide could significantly reduce LLC-MK2 viability only at high concentration of 100  $\mu\text{M}$  when compared to untreated cells. Furthermore, the calculated BatxC  $\text{IC}_{50}$  toward these cells was 138.8  $\mu\text{M}$ , which showed an interesting selectivity to *T. cruzi* with a SI of 315.5 to the trypomastigotes, while Bz showed an  $\text{IC}_{50}$  to LLC-MK2 of 614.8  $\mu\text{M}$  and SI of 2.18 to the trypomastigotes (Table 1). According to Fig. 1B, BatxC treatment at 0.44 and 0.88  $\mu\text{M}$  for 24 and 48 h significantly reduced the number of amastigotes per 100 LLC-MK2 cells compared to untreated infected cells. Bz could also significantly reduce the number of amastigotes in LLC-MK2 after treatment at 282 and 564  $\mu\text{M}$  for 24 and 48 h.

According to Fig. 2, *T. cruzi* epimastigotes treatment with BatxC peptide at 11.3  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) and 22.6  $\mu\text{M}$  ( $2\times \text{IC}_{50}$ ) for 6 h resulted in an increase in 7-AAD labeled (upper left quadrant) parasites (17% and 12% respectively) compared to non-treated cells (0.7%). When the parasites were treated for 24 h, the percentage of 7-AAD labeled cells increased for both concentrations (27%), indicating that *T. cruzi* death occurs predominantly by necrosis.

Two additional assays checked the generation of ROS and the disruption of mitochondrial transmembrane potential that



**Fig. 1.** Cytotoxicity effect of Batroxidicin (BatxC) on LLC-MK2 cells in MTT assay (A). Effect of BatxC on intracellular amastigotes in amastigote/100 cells at 24 and 48 h of incubation (B).

corroborates the mechanism of parasite death. Fig. 3A shows that *T. cruzi* epimastigotes treatment with BatxC at its  $\text{IC}_{50}$  resulted in the generation of ROS, as identified by the increase of DCFH-DA fluorescent signal (shift to the right), especially after 24 h of incubation, compared to the non-treated parasites. Meanwhile, when rhodamine 123 was used, epimastigotes treated with 11.3  $\mu\text{M}$  of the peptide exhibited a gradual decrease (shift to the left) in fluorescence emission, which is noticed in particular after 24 h of incubation, suggesting alteration of mitochondrial transmembrane potential in BatxC-treated parasites (Fig. 3B).

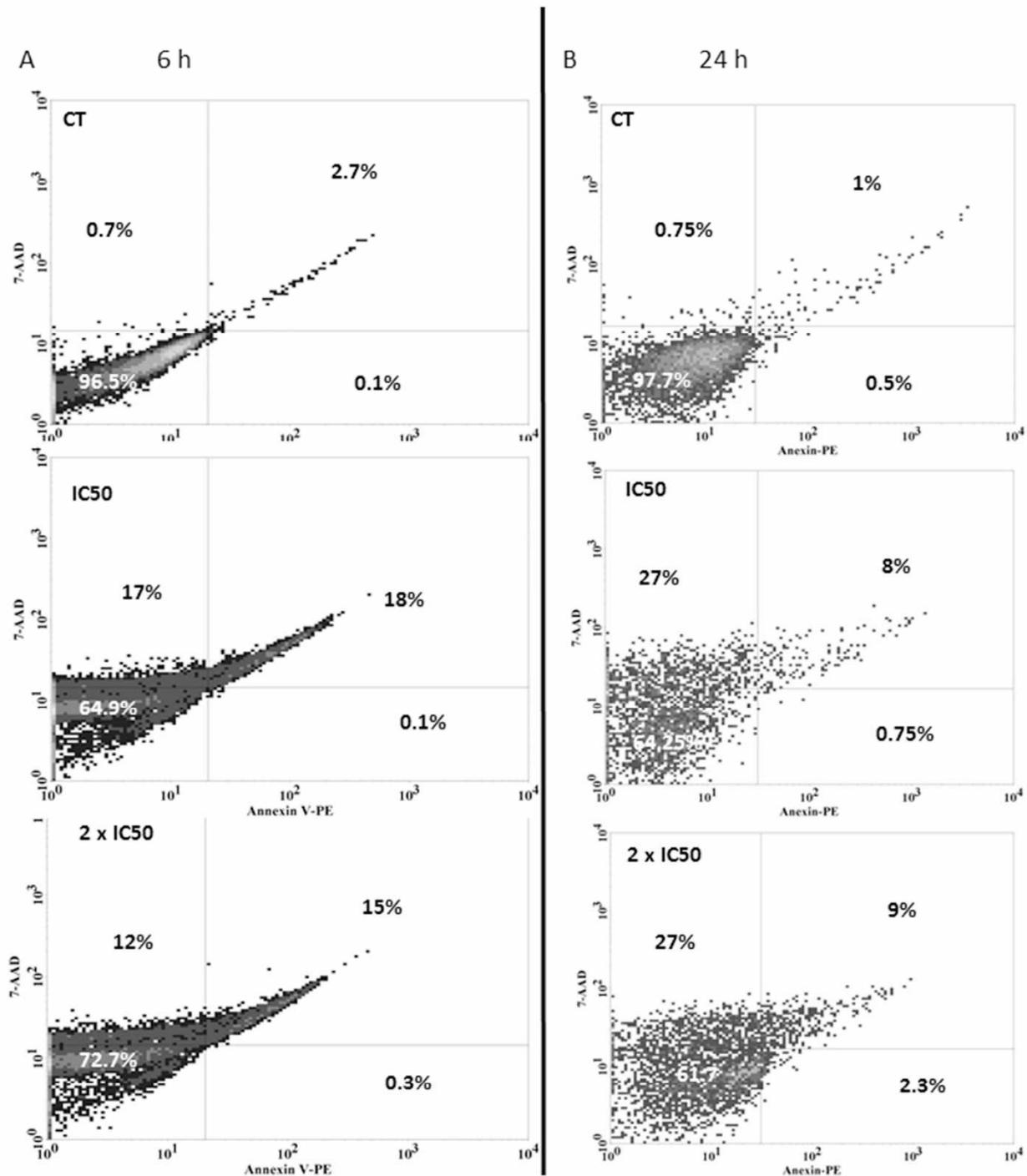
Autophagy cell death was also investigated to verify whether there were other pathways of induced death besides necrosis. *T. cruzi* treated with BatxC (at its  $\text{IC}_{50}$ ) were incubated with acridine orange to detect swelling of the reservosomes that are acidic vesicles. After 6 and 24 h of incubation, however, flow cytometry analysis (Fig. S1) did not show any significant fluorescent signal increment compared to non-treated *T. cruzi*.

Finally, scanning electron microscopy (SEM) images with

**Table 1**  
Effect of Batroxidicin over *Trypanosoma cruzi* and mammalian cells.

	Epimastigote ( <i>T. cruzi</i> )		Trypomastigote ( <i>T. cruzi</i> )		LLC-MK2	
	BatxC	Bz	BatxC	Bz	BatxC	Bz
24 h	11.3 $\pm$ 1.6	218 $\pm$ 15	0.44 $\pm$ 0.05 (315.5)	282 $\pm$ 20 (2.18)	138.8 $\pm$ 20	614.8 $\pm$ 30
48 h	6.33 $\pm$ 1.7	61.1 $\pm$ 3	nd	Nd	nd	nd
72 h	9.6 $\pm$ 3.5	16.5 $\pm$ 1	nd	Nd	Nd	nd

(Epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* (strain Y) were quantified by counting in hemocytometer; viability of LLC-MK2 cells were evaluated by MTT assay. SI values were expressed between parentheses.  $\text{IC}_{50}$  values are expressed in  $\mu\text{M}$ . Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments; nd, Not determined).

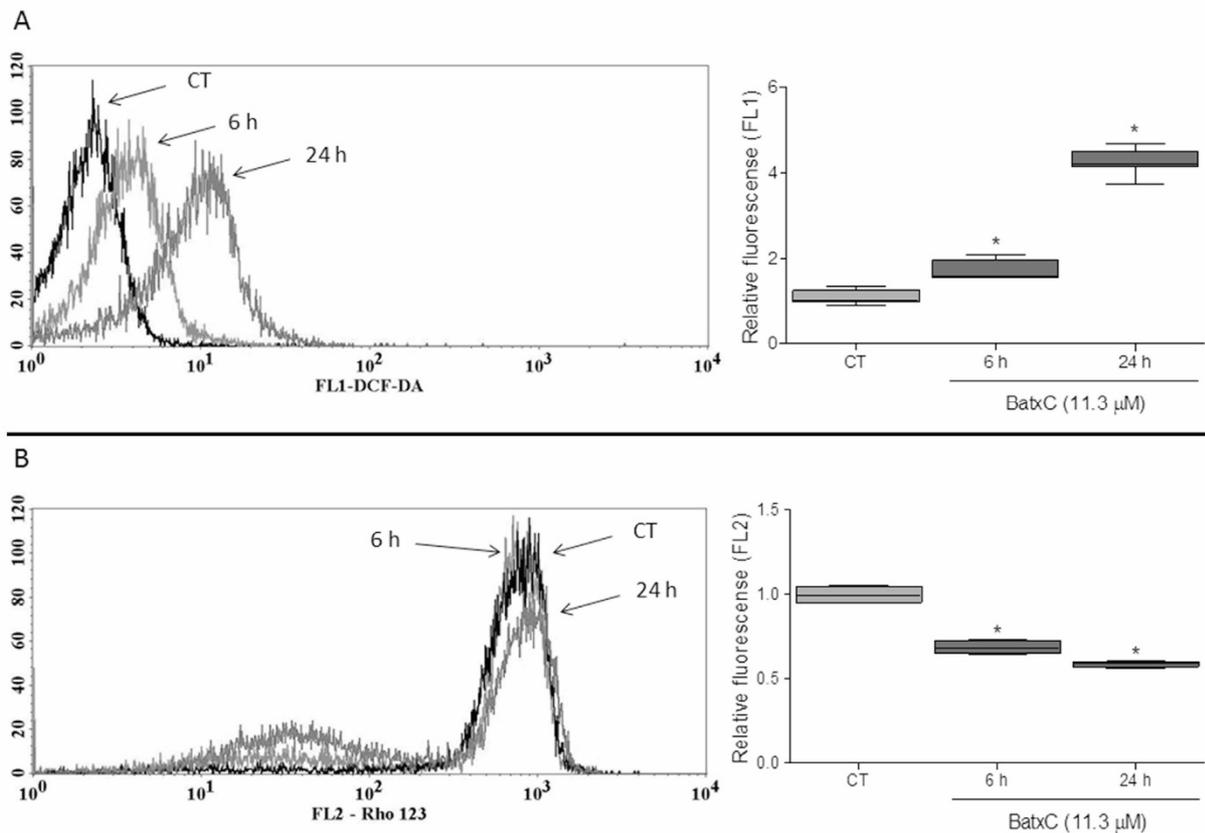


**Fig. 2.** Representative flow cytometry scattering graphs of *T. cruzi* epimastigotes treated with Batroxicidin at 11.3 and 22.6  $\mu\text{M}$  for 6 and 24 h. Percentage values are averages of 10,000 live events from three independent experiments.

epimastigotes treated for 24 h with the BatxC peptide (11.3  $\mu\text{M}$ ) were obtained that are displayed in Fig. 4. Comparison of a non-peptide-treated epimastigote (Fig. 4A) and peptide-treated, revealed that the parasite cellular membrane became severely damaged (Fig. 4B–D) with the presence of pores (Fig. 4C), when treated with BatxC, which are typical evidences of necrosis and corroborate the biochemical evidences of such mechanism of peptide action, confirming the flow cytometry data.

#### 4. Discussion

There is a constant and urgent need to discover and develop new drugs for the treatment of neglected tropical diseases. For Chagas' disease, one of these neglected diseases, the only two available drugs are nifurtimox and benzimidazole. They are only effective in the acute phase and cause severe toxic side-effects in adults (Morilla and Romero, 2015). Furthermore, Bz was developed



**Fig. 3.** A representative histogram of DCFH-DA fluorescent signal and relative fluorescence values (from three independent experiments) from *T. cruzi* epimastigotes that were initially treated with Batroxicidin at 11.3  $\mu$ M for 6 and 24 h (A) and a representative histogram of rhodamine 123 (Rho 123) fluorescent signal and relative fluorescence values (from three independent experiments) from *T. cruzi* epimastigotes initially treated with Batroxicidin at 11.3  $\mu$ M for 6 and 24 h (B).

more than 40 years ago and some benzimidazole-resistant strains have already appeared (Rodrigues et al., 2014). Batroxicidin, cathelicidin-related peptide, exhibited anti-*Trypanosoma cruzi* activity against all developmental forms of a benzimidazole-resistant strain of *T. cruzi* with necrotic pathway involved in a proliferative form.

*T. cruzi* can assume three different morphological forms along their life cycle, which depend on the interaction with a host or a reservoir; they are epimastigote (the proliferative insect vector-borne stage), trypomastigote (the infective, non-proliferative form) and amastigote (intracellular proliferative form) (Adade et al., 2013). The proliferative forms, amastigote and epimastigote, have similar structure of a kinetoplast, a complex structure bearing the mitochondrial genome (De Souza, 2002; Girard et al., 2016). The similarity of kinetoplast from these two forms and the easily maintenance in cultures became epimastigote forms interesting to study cell death pathway. Trypomastigote and amastigote forms were obtained by infection of mammalian cells LLC-MK2. This renal cell line supports a high percentage of infected cells, high inter-orientation index (parasites/cell) and high number of trypomastigotes releases (Zingales et al., 1982, 1997; Andrews and Colli, 1982).

Viperidins, AMPs cathelicidins from pit viper gland venoms, have shown antimicrobial and anti-cancer activity (Falcão et al., 2014, 2015; Cavalcante et al., 2016). In this study, we tested the viperidicin BatxC against *Trypanosoma cruzi* and mammalian cells.

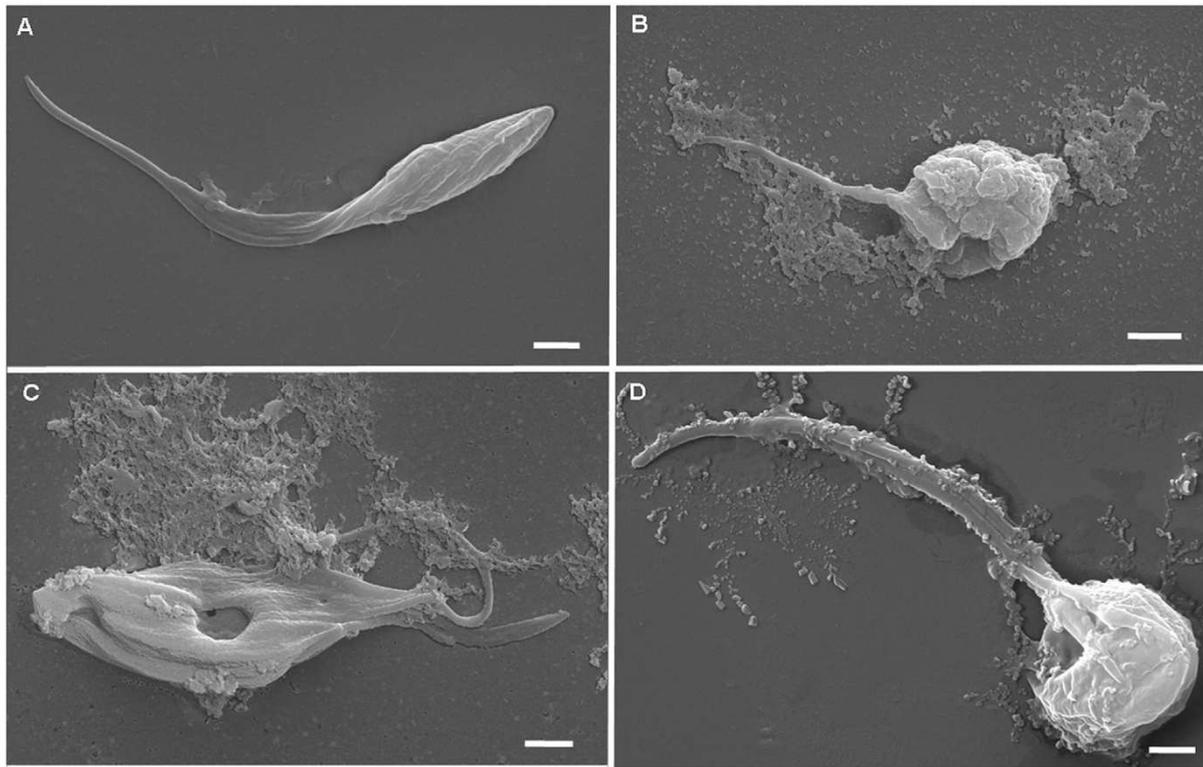
Facing the challenge of developing new drugs, the safety superior to Bz is mandatory (Morilla and Romero, 2015). Importantly, BatxC displayed a low toxicity toward LLC-MK2 host cells. Considering the LC50 concentrations against the trypomastigotes,

BatxC SI was 315, while Bz SI was only 2.18, which shows that BatxC peptide possesses a greater selectivity than Bz against the *T. cruzi* Y strain. Moreover, BatxC SI was well above the minimum required ( $SI \geq 50$ ) by the WHO/TDR guidelines for a potential drug candidate against *T. cruzi* to be considered as a hit (Nwaka and Hudson, 2006). BatxC also was able to reduce the number of amastigote forms at concentrations of 0.44 and 0.88  $\mu$ M, while Bz showed effect in concentrations of 280 and 560  $\mu$ M. These concentrations were chosen based on their LC50 of trypomastigotes, the blood circulating form.

Other cathelicidins have also shown anti-protozoan activity by killing both insect and bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei* through disruption of cell membrane integrity, which decreased parasitemia and prolonged mice survival with late-stage *T. brucei* infection (McGwire et al., 2003). In addition, eCATH1 (equine cathelicidin) was able to kill *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* causing plasma membrane permeabilization and disruption of mitochondrial membrane potential (Cauchard et al., 2016).

BatxC also was able to decrease transmembrane potential of mitochondria of a proliferative form, showing promising trypanocidal activity. Generation of ROS has been observed in parasites treated with BatxC, as well treated with Bz (Rigalli et al., 2016), but BatxC have showed more safety in this work.

In this study, BatxC was able to kill the etiologic agent of Chagas' disease, *T. cruzi*. The labelling with 7AAD and 7AAD/AX in BatxC-treated parasites at two periods indicates lysis of the cell membrane a short and long time, confirmed by MEV, which showed degradation of cellular membrane with pores.



**Fig. 4.** Scanning electron microscopy of control epimastigotes (A) and treated epimastigotes with  $IC_{50}$  of Batroxicidin (B–D). Morphological alterations were observed, such cellular membrane severely damaged (B–D) and loss of cell membrane integrity with the presence of pores (C). Scale bars: 1  $\mu$ m.

All of the observed morphological changes in addition to the flow cytometry data suggest that BatxC causes necrotic cell death in *T. cruzi*. The hallmarks of this type of death involve alterations in mitochondria, including mitochondrial depolarization, ATP depletion, generation of ROS, loss of calcium homeostasis, cytoplasmic vacuolization and, ultimately, breakdown of the plasma membrane (Menna-Barreto et al., 2009).

Recently, it demonstrated that AMPs possess membrane lytic activities that are naturally designed to target the cellular membrane of pathogens (Sani and Separovic, 2016), but it could be related to hemolytic effect. BatxC has low hemolytic effect, reaching 10% hemolysis at 12.5  $\mu$ M (Falcão et al., 2014).

Different cell death pathways were found in some AMPs from animal venom tested against *T. cruzi*. Melittin caused apoptosis and autophagy in *T. cruzi* (Adade et al., 2013). In our work, autophagic cell death by BatxC was also investigated but no evidences were observed with the acridine orange assay.

The most important findings of the present study were the activity of BatxC against the amastigote form and the high selective index. Amastigotes maintain the infections by *T. cruzi* and BatxC concentrations more than 300 times lower to those required to cause damage to host cells can inhibit amastigote proliferation.

In conclusion, BatxC, a cathelicidin-related peptide from the venom gland of *Bothrops atrox*, not only has antibacterial properties but also exhibited anti-*T. cruzi* activity. Moreover, all *T. cruzi* morphological forms (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes) were susceptible to the BatxC, which can kill the epimastigote parasite form by inducing necrosis. Noteworthy, the peptide greater selectivity for *T. cruzi* trypomastigote forms than Bz, compared to activity against healthy mammalian cells, make BatxC a promising drug candidate or a lead for the development of new

drugs to treat Chagas' disease.

#### Ethical statement

The experiments follow the methodology recommended by the international ethical standards of the scientific committee of our university.

#### Acknowledgements

We thank Analytic Centre - UFC/CT - INFRA/Pro – Equipamento CAPES. We thank Research work at the Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, granted to G.R-B., was developed under the auspices of the Program on Toxinology (Issue 2010), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Ministry of Education (ME). C.B.F. is an associate researcher from the National Program for Post-Doctorates (CAPES/ME) at the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, the Federal University of Ceara.

#### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.031>.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.031>.

## References

- Adade, C.M., Carvalho, A.L., Tomaz, M.A., Costa, T.F., Godinho, J.L., Melo, P.A., et al., 2014. Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3252.
- Adade, C.M., Oliveira, I.R., Pais, J.A., Souto-Prádon, T., 2013. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* 69, 227–239.
- Andrews, N.W., Colli, W., 1982. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* 29, 264–269.
- Cauchard, S., Van Reet, N., Büscher, P., Goux, D., Grötzinger, J., Leippe, M., Cattoir, V., Laugier, C., Cauchard, J., 2016. Killing of Trypanozoon parasites by the equine cathelicidin eCATH1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2610–2619.
- Cavalcante, C.S., Falcão, C.B., Fontenelle, R.O., Andreu, D., Rádis-Baptista, G., 2016. Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2016.135>, 2016 Nov 23 [Epub ahead of print].
- De Souza, W., 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 8, 269–285.
- Falcão, C.B., de La Torre, B.G., Pérez-Peinado, C., Barron, A.E., Andreu, D., Rádis-Baptista, G., 2014. Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* 46, 2561–2571.
- Falcão, C.B., Pérez-Peinado, C., de la Torre, B.G., Mayol, X., Zamora-Carreras, H., Jiménez, M.Á., Rádis-Baptista, G., Andreu, D., 2015. Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* 58, 8553–8563.
- Gao, W., Xing, L., Qu, P., Tan, T., Yang, N., Li, D., Chen, H., Feng, X., 2015. Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism. *Sci. Rep.* 26, 17260.
- Girard, R.M., Crispim, M., Stolić, I., Damasceno, F.S., Santos da Silva, M., Pral, E.M., Elias, M.C., Bajić, M., Silber, A.M., 2016. An aromatic diamidine that targets kinetoplast DNA, impairs the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*, and diminishes Trypomastigote release from infected mammalian host cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5867–5877.
- Harvey, A.L., 2014. Toxins and drug discovery. *Toxicon* 15, 193–200.
- Lima, D.B., Sousa, P.L., Torres, A.F., Rodrigues, K.A., Mello, C.P., Menezes, R.R., Tessarolo, L.D., Quinet, Y.P., de Oliveira, M.R., Martins, A.M., 2016. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. *Toxicon* 120, 128–132.
- Marin-Neto, J.A., Rassi Jr., A., Avezum Jr., A., Mattos, A.C., Rassi, A., Morillo, C.A., Sosa-Estani, S., Yusuf, S., BENEFIT Investigators., 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 319–324.
- McGwire, B.S., Kulkarni, M.M., 2010. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp. Parasitol.* 126, 397–405.
- McGwire, B.S., Olson, C.L., Tack, B.F., Engman, D.M., 2003. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J. Infect. Dis.* 188, 146–152.
- Menna-Barreto, R.F., Salomão, K., Dantas, A.P., Santa-Rita, R.M., Soares, M.J., Barbosa, H.S., de Castro, S.L., 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 40, 157–168.
- Morilla, M.J., Romero, E.L., 2015. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine (Lond)* 10, 465–481.
- Nwaka, S., Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 941–955.
- Rádis-Baptista, G., 2015. Viperidins, snake venom cathelicidin-related peptides, in the milieu of reptilian antimicrobial polypeptides. In: Gopalakrishnakone, P., Inagaki, Hidetoshi, Mukherjee, Ashis K., Rahmy, Tarek R., Vogel, Carl-Wilhelm (Eds.), *Snake Venoms*. Springer, Netherlands, pp. 1–25. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8\\_2-1](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8_2-1).
- Rigalli, J.P., Perdomo, V.G., Ciriaci, N., Francés, D.E., Ronco, M.T., Bataille, A.M., Ghanem, C.I., Ruiz, M.L., Manautou, J.E., Catania, V.A., 2016. The trypanocidal benzimidazole promotes adaptive response to oxidative injury: involvement of the nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 304, 90–98.
- Rodrigues, J.H., Ueda-Nakamura, T., Corrêa, A.G., Sangi, D.P., Nakamura, C.V., 2014. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benzimidazole, against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 9, e85706.
- Sani, M.A., Separovic, F., 2016. How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Acc. Chem. Res.* 49, 1130–1138.
- Teixeira, V., Feio, M.J., Bastos, M., 2012. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* 51, 149–177.
- Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D.V., Takahashi, N., Vandenabeele, P., 2013. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 61, 117–129.
- Volpato, H., Desoti, V.C., Valdez, R.H., Ueda-Nakamura, T., Silva, SdO., Sarragiotto, M.H., Nakamura, C.V., 2015. Mitochondrial dysfunction induced by N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxamide is required for cell death of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 10, e0130652.
- World Health Organization (WHO), 2016. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact sheet N° 340 Updated March 2016. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- Zingales, B., Andrews, N.W., Kuwajima, V.Y., Colli, W., 1982. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 111–124.
- Zingales, B., Pereira, M.E., Almeida, K.A., Umezawa, E.S., Nehme, N.S., Oliveira, R.P., Macedo, A., Souto, R.P., 1997. Biological parameters and molecular markers of clone Cl Brener—the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 811–814.

# **ANEXOS**

---

## ANEXO A

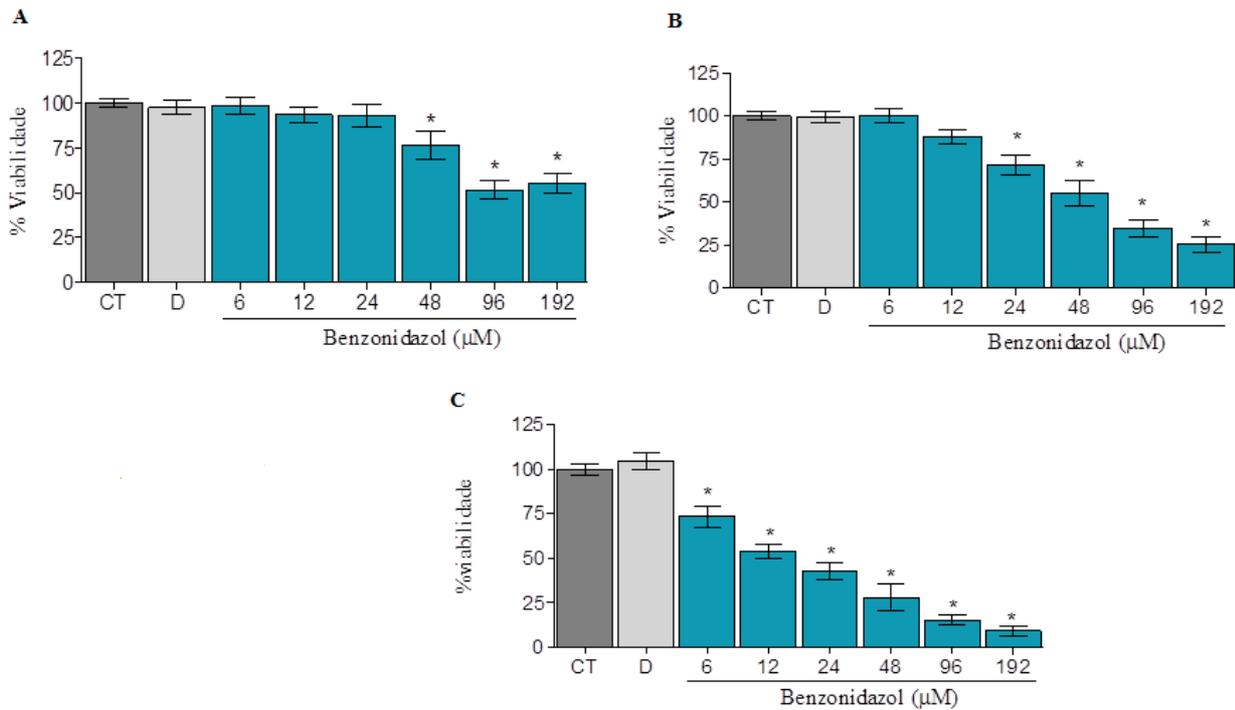
**Tabela 4.** Efeito do Benzonidazol em *Trypanossoma cruzi* e células de mamífero.

	Epimastigote ( <i>T. cruzi</i> )	Trypomastigote ( <i>T. cruzi</i> )	LLC-MK2
	Bz	Bz	Bz
24 h	218±15	282±20 (2.18)	614.8±30
48 h	61.1±3	nd	nd
72 h	16.5±1	nd	nd

**Fonte:** Lima *et al.*,2016.

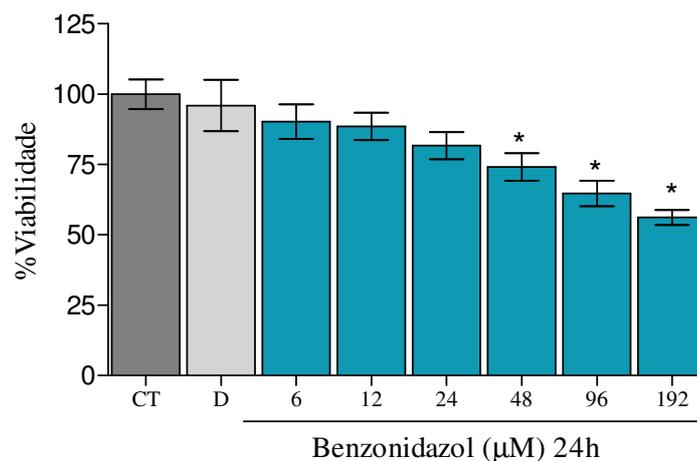
**Legenda:** As formas epimatigote e tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi* foram quantificadas por contagem em câmara de Neubauer e as células LLC-MK2 foram quantificadas por ensaio de MTT. Os valores de IC<sub>50</sub> expressos em µM. Os dados são expressos como médias ± SEM De 3 experimentos independentes.

## ANEXO B

**Figura 35.** Efeito citotóxico do Benzonidazol sobre a forma epimastigota de *T.cruzi*.

**Fonte:** Lima *et al.*, 2016.

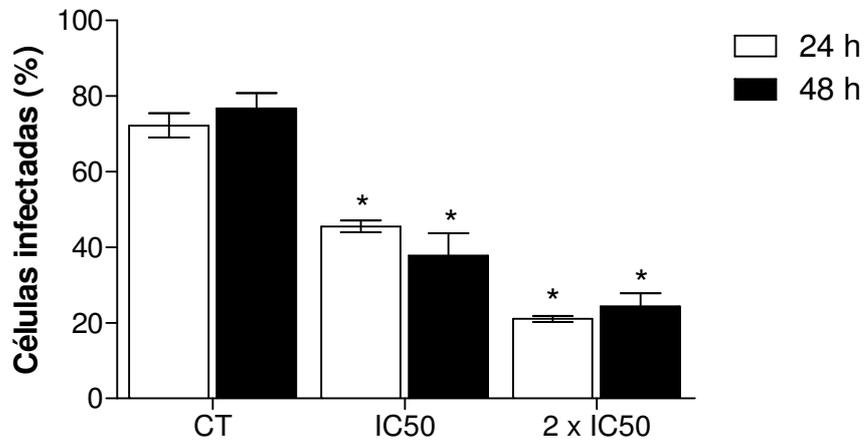
**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24(A), 48(B), e 72h(C) de tratamento com Benzonidazol . Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com  $*p < 0,05$ .

**Figura 36.** Efeito citotóxico do Benzonidazol sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi*.

**Fonte:** Lima *et al.*, 2016.

**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24(A), 48(B), e 72h(C) de tratamento com Benzonidazol . Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com  $*p < 0,05$ .

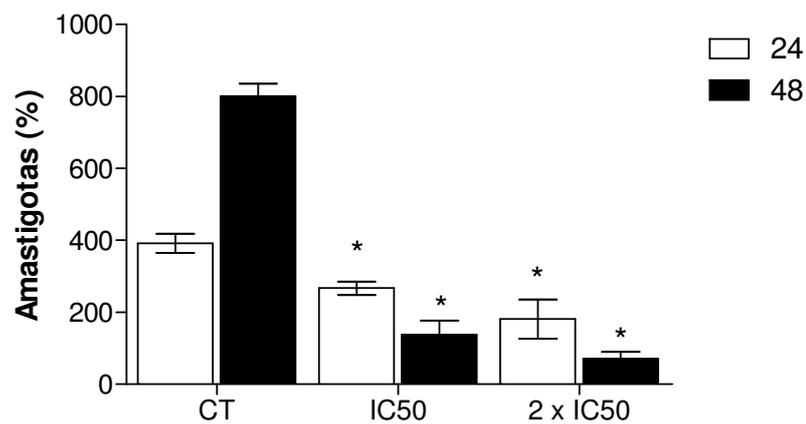
**Figura 37.** Percentual de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas e incubadas com Benzonidazol.



**Fonte:** Lima *et al.*, 2016.

**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n=2), após 24 e 48h de incubação com Benzonidazol. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com  $*p < 0,05$ , comparados ao grupo controle.

**Figura 38.** Percentual de amastigotas em células tratadas com Benzonidazol



**Fonte:** Lima *et al.*, 2016.

**Legenda:** Os dados foram expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n=2), após 24 e 48h de incubação com Benzonidazol. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com  $*p < 0,05$ , comparados ao grupo controle.

## ANEXO C

Toxicon 120 (2016) 128–132



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

Short communication

Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom

Danya Bandeira Lima <sup>a</sup>, Paloma Leão Sousa <sup>a</sup>, Alba Fabíola Costa Torres <sup>a</sup>,  
Klinger Antonio da França Rodrigues <sup>b</sup>, Clarissa Perdigão Mello <sup>a</sup>,  
Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes <sup>c</sup>, Louise Donadello Tessarolo <sup>a</sup>,  
Yves Patric Quinet <sup>d</sup>, Márcia Rosa de Oliveira <sup>e</sup>, Alice Maria Costa Martins <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

<sup>b</sup> Post-graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactives, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

<sup>d</sup> Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

<sup>e</sup> Department of Molecular Biology, Center of Exact Sciences and of the Nature, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 June 2016

Received in revised form

10 August 2016

Accepted 11 August 2016

Available online 13 August 2016

## Keywords:

*Dinoponera quadriceps**Trypanosoma cruzi**Leishmania amazonensis*

Venom

## ABSTRACT

Neglected tropical diseases (NTD) are treated with toxic therapy of limited efficacy. Previously, we studied the antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* venom (DqV) against bacteria. To continue the study, we report in this short communication the antimicrobial effect of DqV against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. DqV inhibits the promastigote forms of *L. amazonensis* and all *T. cruzi* developmental forms, with low toxicity in host cells. DqV causes cell death in *T. cruzi* through necrotic and apoptotic mechanisms observed by staining the cells with annexin V-FITC (AX) and propidium iodide (PI), loss of mitochondrial membrane potential by flow cytometry analyses and confocal microscopy and morphological alterations, such as loss of membrane integrity and cell shrinkage by scanning electron microscopy (SEM). In conclusion, we suggest there is an antimicrobial effect also on parasites.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The World Health Organization (WHO) estimates that the Neglected Tropical Diseases (NTDs) affect proximally 37% of the world's poorest individuals (WHO, 2010b; Berkowitz et al., 2015). The NTDs cause significant disfigurement, morbidity and mortality, accounting for 1% of the global burden of disability-adjusted life years lost in 2010 (Hotez et al., 2014).

Chagas disease and Leishmaniasis are the first and third most prevalent NTDs in the world, respectively. It is estimated that 7 to 8 million people are infected with *T. cruzi* and 1.3 million are infected with *Leishmania* (WHO, 2010b; WHO, 2013). The treatment of parasitic diseases is of limited effectiveness and has severe collateral effects (WHO, 2010a; Murcia et al., 2012; Silva et al., 2014). Therefore, several studies have sought to discover novel antiparasitic substances from natural sources (Passero et al., 2007; Adade et al., 2011, 2013; 2014).

Recently, our group produced a *Dinoponera quadriceps* venom

gland cDNA library to investigate the toxin repertoire present in the venom used in this study. This venom has 30% of dinoponeratoxins in its composition and has high homology with ponicins, antimicrobial peptides (Torres et al., 2014). Antimicrobial peptides from venoms of many organisms have shown antiparasitic effect on *Leishmania* and *Trypanosoma* genera (McGwire and Kulkarni, 2010). Recently, we demonstrated the antimicrobial action of *D. quadriceps* venom against bacteria (Lima et al., 2014). To continue the study of the antimicrobial effect of *D. quadriceps* venom (DqV), we report in this short communication its action on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*.

## 2. Material and methods

## 2.1. Venom

*D. quadriceps* venom (DqV) was obtained as described by Sousa et al. (2012). For the experimental assays, final concentrations of 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 and 0.78 µg/ml were utilized, with Sterile PBS being used as negative control (pH 7.4).

\* Corresponding author.

E-mail address: [martinsalice@gmail.com](mailto:martinsalice@gmail.com) (A.M.C. Martins).

## 2.2. Effect of *D. quadriceps* venom on promastigote forms of *L. amazonensis*

Promastigote forms of *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) were cultivated in NNN/Schneider medium (Sigma–Aldrich™, St. Louis, USA) supplemented with 20% of fetal bovine serum (FBS) and antibiotics with different concentrations of DqV and amphotericin B (Cristália, São Paulo, Brazil) at 26 °C for 72 h. Parasite growth inhibition was quantified in a Neubauer chamber (Torres et al., 2010).

## 2.3. Effect of *D. quadriceps* venom on epimastigote forms of *T. cruzi*

Epimastigote forms of *T. cruzi* strain Y were plated in Liver Infusion Tryptose medium supplemented with antibiotics and 10% of FBS with different concentrations of DqV and Benznidazole (Bz), incubated at 28 °C for 24 and 48 h. Parasite growth inhibition was quantified in a Neubauer chamber (Abe et al., 2002; Gonçalves et al., 2002).

## 2.4. Effect of *D. quadriceps* venom on trypomastigote forms of *T. cruzi*

The trypomastigote forms of *T. cruzi* obtained by infecting LLCMK2 cells, were incubated at 37 °C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium (Vitrocell, São Paulo, Brazil) supplemented with antibiotics and 2% of FBS (Aparicio et al., 2004). Cells were incubated with different concentrations of DqV and Bz for 24 h. Parasite growth inhibition was quantified in a Neubauer chamber (Abe et al., 2002; Gonçalves et al., 2002).

## 2.5. Cytotoxicity to mammalian cells (MTT assay)

Cell viability was also measured using a standard MTT assay (Mosmann, 1983). LLC-MK2 cells were plated in the DMEM medium, treated with different concentrations of DqV and incubated at 37 °C for 24 h. MTT (Amresco, Ohio, USA; 5 mg/mL) was added and the cells were incubated for 4 h, when 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS; Vetec, São Paulo, Brazil) was added to solubilize the formazan product. Cell viability measurements were performed at 570 nm on a microplate reader (Biochrom® Asys Expert Plus). Selectivity index (SI) was calculated by the ratio of cytotoxic/trypanocidal activity (Gallé et al., 2013).

## 2.6. Effect of *D. quadriceps* venom on amastigote forms of *T. cruzi*

LLC-MK2 cells were seeded in 24-well plates containing glass coverslips (13-mm diameter) cultivated in DMEM supplemented with 10% FCS, and maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h. Cells were infected with trypomastigote forms (parasite: host cell ratio of 20:1) in DMEM medium containing 2% FCS. After 48 h of infection, the non-internalized parasites were removed and the cells were cultivated in 2% FCS DMEM medium with or without DqV (1.98 and 3.96 µg/mL) and Bz (73.4 and 146.8 µg/mL). The coverslips were collected up to 24 h and 48 h, washed with PBS, fixed in Bouin's solution and stained with Giemsa (Adade et al., 2011). The percentage of infected cells and the number of intracellular amastigotes per 100 cells was determined by counting 300 cells in triplicate.

## 2.7. Cytometry flow analysis

Epimastigote forms treated with IC<sub>50</sub> of DqV (28.32 µg/mL) incubated for 24 h were stained with FITC-conjugated to annexinV/propidium iodide according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, California, USA). The population of AX-PI viable cells

was evaluated. Mitochondrial transmembrane potential and swelling of reservosomes were also determined. Epimastigote forms were treated with IC<sub>50</sub> (28.32 µg/mL) and 2 x IC<sub>50</sub> (56.64 µg/mL) of DqV for 24 h and stained with Rhodamine 123 (10 µg/mL) and Acridine Orange (5 µg/mL) according to the manufacturer's instructions (Sigma–Aldrich™, St. Louis, USA). The results were established by determining the fold change (treated/non-treated cell ratio) of the geometric mean of fluorescence. At the end of each incubation period, the cells were washed and submitted to cytometry flow analysis. All data were collected in a FACSCalibur system and analyzed using the Cell Quest software (Becton-Dickinson, California, USA).

## 2.8. Confocal microscopy

Epimastigote forms were incubated with IC<sub>50</sub> (28.32 µg/mL) and 2 x IC<sub>50</sub> (56.64 µg/mL) of DqV for 24 h at 28 °C. The parasites were washed and labeled with Rhodamine 123 (10 µg/mL) to observe the mitochondrial transmembrane potential. At the end of the incubation time, the cells were washed and the slides were mounted. The cells were analyzed under a LSM 710 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Germany).

## 2.9. Scanning electron microscopy (SEM)

Epimastigotes forms were treated with IC<sub>50</sub> (28.32 µg/mL) and 2 x IC<sub>50</sub> (56.64 µg/mL) of DqV for 12 h. After incubation, the parasites were fixed for 2 h with 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) washed, dehydrated, dried with CO<sub>2</sub>, coated with gold and observed in a FEG Quanta 450 scanning electron microscope (FEI, Oregon, USA). Digital images were acquired and stored in a computer.

## 2.10. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). IC<sub>50</sub> values were determined by nonlinear regression. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. Significance was defined as \*p < 0.05.

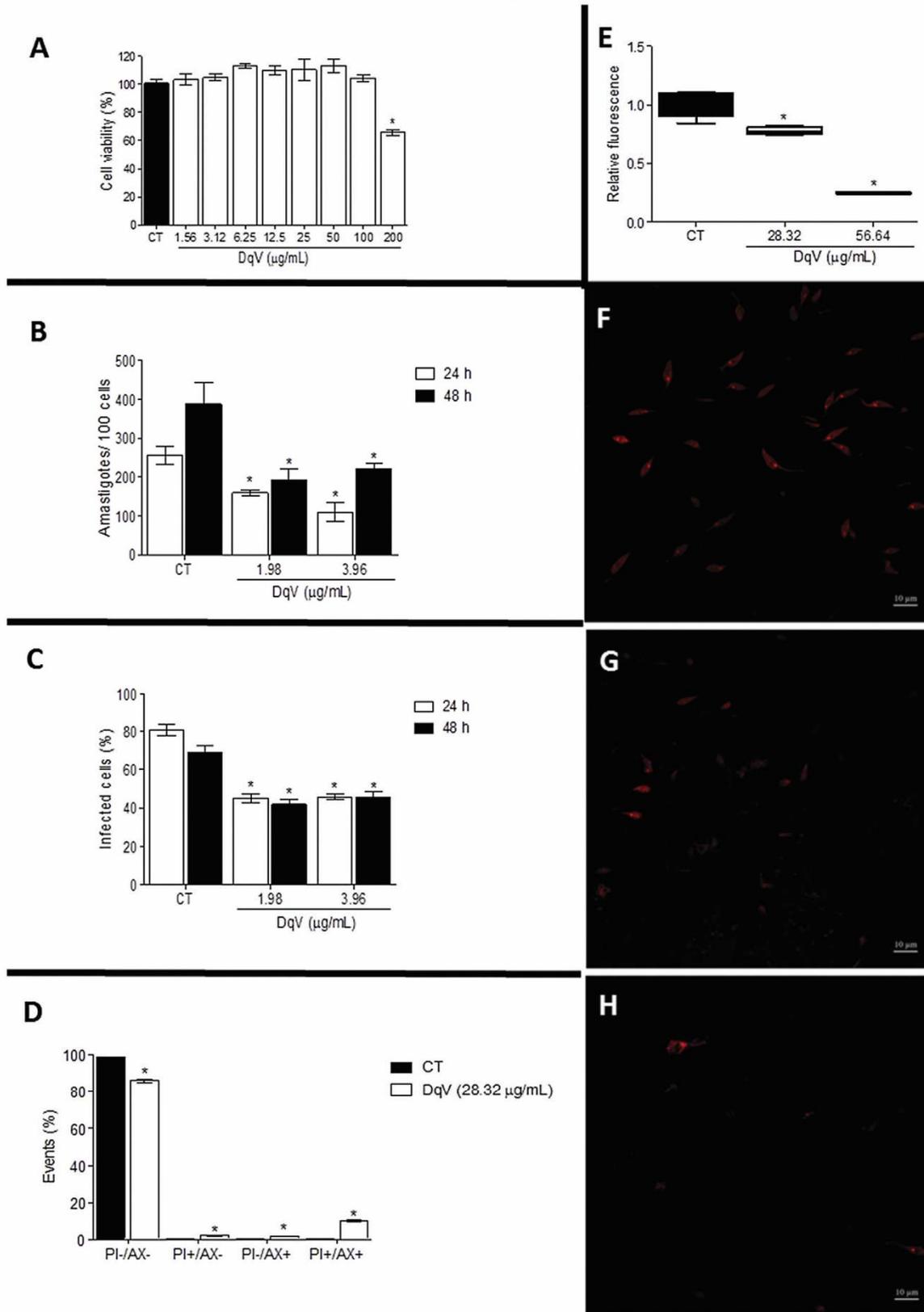
## 3. Results and discussion

Venom components are of great biotechnological interest, as they are useful to identify new therapeutic targets and establish molecular models for the development of new drugs, with improved efficacy and less toxicity (Harvey, 2014).

Benznidazole and nifurtimox are the only drugs currently being used to treat Chagas' disease; both are highly toxic and rarely beneficial during the chronic phase, with a cure rate of approximately 20% (Urbina and Docampo, 2003). Meglumine antimoniate, sodium stibogluconate, amphotericin B, pentamidine, and miltefosine are the current therapeutic options used to treat Leishmaniasis, which are also highly toxic (D'Annessa et al., 2015).

Leishmanicidal activity by animal venom has been demonstrated (Passero et al., 2007; Pinto et al., 2014). In this study, the growth of promastigote forms of *L. amazonensis* was inhibited by DqV with IC<sub>50</sub> of 63.76 ± 20 µg/mL whereas IC<sub>50</sub> of amphotericin B was 0.18 ± 0.2 µg/mL after 72 h of incubation.

The treatment of *T. cruzi* epimastigotes with DqV resulted in dose-dependent growth inhibition, with an IC<sub>50</sub>/24 h treatment of 28.32 ± 5 µg/mL and IC<sub>50</sub>/48 h of 20.82 ± 5 µg/mL, while BZ showed IC<sub>50</sub>/24 h treatment of 56.76 ± 15 µg/mL and IC<sub>50</sub>/48 h of 15.91 ± 3 µg/mL. Treatment of trypomastigote forms also resulted



**Fig. 1.** Cytotoxicity effect of *Dinoponera quadriceps* venom on LLC-MK2 cells in MTT assay (A). Effect of *D. quadriceps* venom on intracellular amastigotes in amastigote/100 cells at 24 and 48 h of incubation (B). Effect of *D. quadriceps* venom on intracellular amastigotes in a percentage of infected cells at 24 and 48 h of incubation (C). Evaluation of the cell death pathway of epimastigote forms treated with *D. quadriceps* venom measured by annexin V (AX) and propidium iodide (PI) staining and detected by flow cytometry (FL1) (D). Evaluation of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of epimastigote forms treated with *D. quadriceps* venom measured by Rhodamine 123 staining with flow cytometry analysis (FL2) (E). Evaluation of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of epimastigote forms treated with *D. quadriceps* venom measured by Rhodamine 123 staining with a confocal laser scanning microscope (FL2); Control (F); Cells treated with IC50 of DqV (28.32 µg/mL) (G); Cells treated with 2xIC50 of DqV (56.64 µg/mL) (H). The data represent the mean  $\pm$  S.E.M of at least three independent experiments. \*Significantly different from the control group (One-way analysis of variance and Dunnett's post-test, \*p < 0.05).

in dose-dependent growth inhibition, with an IC<sub>50</sub> of DqV of  $1.98 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$  whereas the IC<sub>50</sub> of BZ was  $73.40 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ . Considering these results, we continued the experiments with *T. cruzi*, the most sensitive parasite.

Venoms from hymenopteran insects have also been reported as showing trypanocidal activity (Adade et al., 2012, 2013). In the present study, *D. quadriceps* venom was able to kill all *T. cruzi* developmental forms and the toxicity evaluated in LLC-MK2 cells showed IC<sub>50</sub> of  $222 \pm 30 \mu\text{g/mL}$  (Fig. 1A), resulting in an SI of 112.12 for trypomastigotes forms. When the SI is > 50, it means that the venom meets the criteria required by the WHO/TDR for *T. cruzi* to be considered a hit (Nwaka and Hudson, 2006).

The effect of the DqV on the amastigote forms showed reduction in the percentage of infected cells and number of amastigotes/100 cells with 1.98 and 3.96  $\mu\text{g/mL}$  of DqV at 24 and 48 h, as well as Bz with 73.4 and 146.8  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 1B; 1C). Similar results were observed with *Apis mellifera* venom (Adade et al., 2012) and melittin (Adade et al., 2013), showing a reduction in intracellular amastigotes in both periods.

Recently, we demonstrated that DqV showed antimicrobial properties causing membrane damage in bacteria (Lima et al., 2014). To identify the cell death mechanism induced by DqV treatment in *T. cruzi*, flow cytometry and confocal microscopy were performed. In this study, DqV treatment caused an increase in the number of AX-/PI+ cells, indicating rupture of plasma membrane, AX+/PI- cells indicating phosphatidylserine exposure and AX+/PI+ cells (Fig. 1D), suggesting involvement of necrotic and

apoptotic pathways.

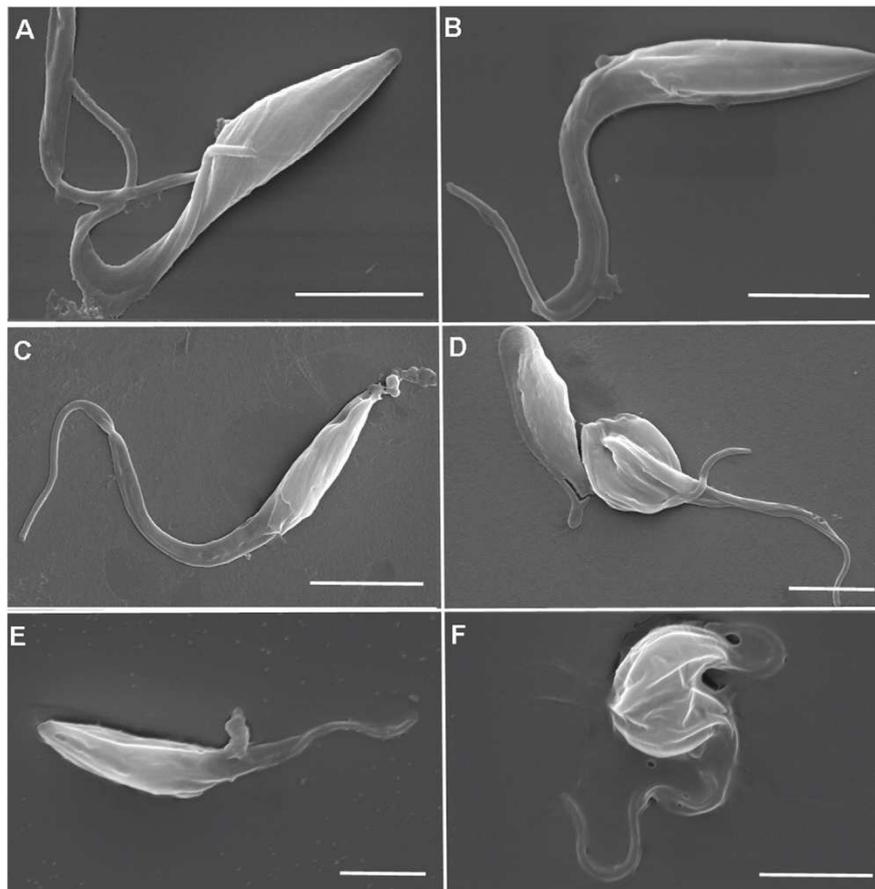
These results show the involvement of both types of cell death in the DqV-treated epimastigote forms. Adade et al. (2012) demonstrated that autophagy and apoptosis are the most frequently observed pathways with *A. mellifera* venom. In the present study, acridine orange staining was used to analyze swelling of reservosomes, a characteristic of autophagic cell death, but no evidence of autophagy was observed.

Alterations in mitochondrial membrane potential can be observed in both types of cell death, necrosis and apoptosis (Krysko et al., 2008). In this study, loss of mitochondrial membrane potential was observed with flow cytometry and confocal microscopy in IC<sub>50</sub> and 2 x IC<sub>50</sub> of DqV, being more expressive with the higher concentration in both methods (Fig. 1E–H).

Epimastigote forms treated with DqV showed morphological alterations that were observed by SEM. The parasites showed loss of membrane integrity with the presence of pores (Fig. 2C; 2E) and cell shrinkage (Fig. 2D; 2F), also showing characteristics of apoptosis and necrosis at both concentrations.

The most important findings of the present study were the activity of DqV against the intracellular amastigote form and the high selective index. Amastigotes develop and maintain the infections by *T. cruzi* and significantly lower DqV concentrations, when compared to those required to cause damage to host cells, inhibit amastigote proliferation.

In conclusion, *D. quadriceps* venom was able to inhibit the promastigote form of *L. amazonensis* and the epimastigote,



**Fig. 2.** Scanning electron microscopy of control epimastigotes (A–B) and treated epimastigotes with IC<sub>50</sub> of DqV (C–D) and 2 x IC<sub>50</sub> of DqV (E–F). Morphological alterations were observed, such pores in membrane were observed (C and E) and abnormal conformation of the cell body with cell shrinkage (D and F). Scale bars: 3  $\mu\text{m}$ .

trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, strain Y, with the involvement of necrotic and apoptotic mechanisms. Therefore, DqV and its components can offer potential tools for the development of new drug candidates against neglected diseases.

### Acknowledgements

We thank Analytic Centre - UFC/CT - INFRA/Pro – Equipment CAPES. We thank National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Cearense Foundation for the Support of Scientific and Technological Development (Funcap) and Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES) for their financial support.

### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.008>.

### References

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., et al., 2002. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1188–1191.
- Adade, C.M., Carvalho, A.L., Tomaz, M.A., Costa, T.F., Godinho, J.L., Melo, P.A., et al., 2014. Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3252.
- Adade, C.M., Chagas, G.S., Souto-Pradrón, T., 2012. Apis mellifera venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 139, 1444–1461.
- Adade, C.M., Cons, B.L., Melo, P.A., Souto-Pradrón, T., 2011. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 138, 46–58.
- Adade, C.M., Oliveira, I.R., Pais, J.A., Souto-Pradrón, T., 2013. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* 69, 227–239.
- Aparicio, I.M., Scharfstein, J., Lima, A.P.C.A., 2004. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect. Immun.* 72, 5892–5902.
- Berkowitz, A.L., Raibagkar, P., Pritt, B.S., Mateen, F.J., 2015. Neurologic manifestations of the neglected tropical diseases. *J. Neurol. Sci.* 349, 20–32.
- D'Annessa, I., Castelli, S., Desideri, A.I., 2015. Topoisomerase 1B as a target against leishmaniasis. *Mini Rev. Med. Chem.* 5, 203–210.
- Gallé, J.B., Attioua, B., Kaiser, M., Rusig, A.M., Lobstein, A., Vonthron-Sénécheau, C., 2013. Eleganolone, a diterpene from the French marine alga *Bifurcaria bifurcata* inhibits growth of the human pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. *Mar. Drugs* 11, 599–610.
- Gonçalves, A.R., Soares, M.J., de Souza, W., DaMatta, R.A., Alves, E.W., 2002. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol. Res.* 88, 598–602.
- Harvey, A.L., 2014. Toxins and drug discovery. *Toxicon* 15, 193–200.
- Hotez, P.J., Alvarado, M., Basanez, M., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., et al., 2014. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLOS NTD* 8, e2865.
- Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., D'herde, K., Vandenabeele, P., 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44, 205–221.
- Lima, D.B., Torres, A.F., Mello, C.P., de Menezes, R.R., Sampaio, T.L., Canuto, J.A., et al., 2014. Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 117, 390–396.
- McGwire, B.S., Kulkarni, M.M., 2010. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp. Parasitol.* 126, 397–405.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Murcia, L., Carrilero, B., Albajar Viñas, P., Segovia, M., 2012. Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Rev. Esp. Quimioter.* 25, 74–75.
- Nwaka, S., Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 941–955.
- Passero, L.F., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., Toyama, M.H., 2007. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol. Res.* 101, 1365–1371.
- Pinto, E.G., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Tempone, A.G., 2014. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of the cutaneous secretion of *Siphonops annulatus*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24, 20–50.
- Sousa, P.L., Quinet, Y., Ponte, E.L., Vale, J.F., Torres, A.F.C., Pereira, M.G., Assreuy, A.M.S., 2012. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. *J. Ethnopharmacol.* 144, 213–216.
- Silva, G.M.S., Mediano, M.F., Alvarenga Americano do Brasil, P.E., da Costa Chambela, M., da Silva, J.A., de Sousa, A.S., Xavier, S.S., Rodrigues da Costa, A., Magalhães Saraiva, R., Hasslocher-Moreno, A.M., 2014. A clinical adverse drug reaction prediction model for patients with chagas disease treated with benznidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6371–6377.
- Torres, A.F., Huang, C., Chong, C.M., Leung, S.W., Prieto-da-Silva, A.R., Havt, A., Quinet, Y.P., et al., 2014. Transcriptome analysis in venom gland of the predatory giant ant *Dinoponera quadriceps*: insights into the polypeptide toxin arsenal of hymenopterans. *PLoS ONE* 9, e87556.
- Torres, A.F.C., Dantas, R.T., Toyama, M.H., Diz Filho, E., Zara, F.J., Rodrigues De Queiroz, M.G., et al., 2010. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon* 55, 795–804.
- Urbina, J.A., Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19, 495–501.
- WHO, 2010a. Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis (WHO Technical Report Series, Geneva, Switzerland).
- WHO, 2010b. Working to Overcome the Impact of Neglected Tropical Diseases. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases.
- WHO, 2013. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases.