



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

IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA CROTALICIDINA -
CATELICIDINA DA GLÂNDULA DO VENENO de *Crotalus durissus terrificus***

FORTALEZA

2017

IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA

Estudo *in vitro* da atividade tripanocida da crotalicidina - catelicidina da glândula do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

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: Profa. Dra. Alice Maria C. Martins

Co-orientador: Prof. 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)

- B1e BANDEIRA, IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA.
ESTUDO IN VITRO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA CROTALICIDINA - CATELICIDINA
DA GLÂNDULA DO VENENO de *Crotalus durissus terrificus* / IZABEL CRISTINA JUSTINO
BANDEIRA BANDEIRA. – 2017.
105 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: Prof. Dr. Alice Maria C. Martins.
1. Trypanosoma cruzi. 2. Doença de Chagas. 3. Crotalicidina. 4. Viperidina. 5. Peptídeo
antimicrobiano. I. Título.

CDD 615

IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DA CROTALICIDINA -
CATELICIDINA DA GLÂNDULA DO VENENO de *Crotalus durissus terrificus***

Tese apresentada ao 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^ª. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Maria Jania Teixeira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Ticiano Praciano Pereira
Faculdade Metropolitana de Fortaleza-FAMETRO

Prof^ª. Dra. Jamile Magalhães Ferreira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB).

À Deus,
que realizou maravilhas ao longo desse trabalho e de toda minha vida
À minha família,
fonte de apoio e exemplo constante de união e amor incondicional. Esse sonho é nosso!
Ao meu esposo,
companheiro de vida nos momentos fáceis e difíceis. Seu apoio e amor foram fundamentais
em mais essa jornada.
À minha filha Melissa,
que vai nascer praticamente junto com essa conquista e, sem dúvida, foi minha maior fonte de
incentivo e motivação.

AGRADECIMENTOS

Em especial, à **Prof. Dra. Alice Costa Martins**, que me recebeu de braços abertos, compartilhou comigo seus ensinamentos dentro e fora das salas de laboratório e confiou em mim o desenvolvimento de um trabalho tão especial. A definição perfeita de MESTRE.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Gandhi**, que confiou a mim a realização de um trabalho tão promissor e sempre esteve disponível às minhas solicitações.

À **Prof. Romélia**, que já me acompanha desde 2010 como primeira orientadora de pós-graduação, com quem tive o prazer e oportunidade de crescer como pessoa, profissional e docente. Meu eterno carinho professora!

À amiga de jornada e agora membro da banca **Prof. Ticiania**, que, muito mais que componente de banca, foi minha tutora durante sua estadia no laboratório. Trabalhar com você, sem dúvidas, me fez conseguir chegar até aqui. Minha gratidão e respeito, Tici.

Aos membros da banca **Profs. Jania e Jamile** que aceitaram prontamente o convite me prestigiando com suas experiências e contribuições.

À, **Prof. Dra. Janaina Serra Azul**, que grandemente contribuiu para este trabalho com seus ensinamentos e sua disponibilidade nas análises histológicas.

Às minhas amigas queridas **Danya Bandeira e Clarissa Perdigão**. De mãos dadas estivemos durante essa jornada, e que assim permaneçamos. Anjos de luz como vocês estarão sempre na minha vida.

Aos **amigos do Laboratório de Nefrologia e Doenças tropicais (LNDR)** pela ajuda nos momentos de aperreio, pela troca de experiências profissionais, mas, principalmente, pelos laços de amizade construídos que levaremos pra vida.

Aos componentes dos laboratórios de pesquisa **LABOMAR e HISTOVESP**, que, junto com seus orientadores, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos **amigos de trabalho e em especial à minha coordenadora de curso da UNICATÓLICA**. Transformar colegas de trabalho em amigos com quem podemos compartilhar momentos torna a jornada mais fácil e prazerosa.

À minha amiga-irmã-comadre **Malu**, por sempre funcionar como minha válvula de escape nesse processo acadêmico.

À todos meus sinceros agradecimentos.

“Não é sobre chegar o topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir
que o caminho te fortaleceu;
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar e sim sobre cada
momento, sorriso a se compartilhar;
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais porque quando
menos se espera a vida já ficou pra trás.
A vida é trem-bala parceiro e a gente é só passageiro prestes a partir.”

RESUMO

As catelicidinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por humanos e animais em resposta a vários micróbios patogênicos. Crotalicidina (Ctn), uma viperacidina relacionada com a catelicidina da glândula de veneno *Crotalus durissus terrificus* proveniente da América do Sul e seus fragmentos (Ctn1-14 e Ctn15-34) demonstraram atividade antimicrobiana e antifúngica, assim como a catelicidina humana LL-37. A fim de fornecer modelos para o desenvolvimento de agentes tripanocidas modernos, no presente estudo avaliamos o efeito antichagásico desses quatro peptídeos (Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34] e LL-37). Ctn e peptídeos derivados foram testados contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (cepa resistente ao benzonidazol) e a citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada em direção à linhagem LLC-MK2. Ctn inibiu todas as formas de desenvolvimento de *T. cruzi*, incluindo amastigota, que está implicada no curso crônico da doença de Chagas. Além disso, Ctn mostrou um alto índice seletivo às formas de tripomastigotas (> 200). Quanto ao mecanismo de ação, Ctn induziu morte celular em *T. cruzi* através de necrose, conforme determinado por análises de citometria de fluxo com sondas moleculares específicas e alterações morfológicas, como perda de integridade da membrana e contração celular, conforme observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). No ensaio *in vivo*, a avaliação da toxicidade aguda pelo método Up-and-Down mostrou que Ctn não promove alterações hematológicas, bioquímicas e não causa dano em órgãos dos animais. Assim sendo, Ctn aparece como um modelo promissor para o desenvolvimento de agentes antichagásicos.

Palavras-chave: Crotalicidina; Viperacidina; *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas;
Peptídeo antimicrobiano

ABSTRACT

Cathelicidins are antimicrobial peptides produced by humans and animals in response to various pathogenic microbes. Crotalicidin (Ctn), a cathelicidin-related viperacidin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom gland, and its fragments have demonstrated antimicrobial and antifungal activity, likewise human cathelicidin LL-37. In order to provide templates for the development of modern trypanocidal agents, in the present study we evaluated the antichagasic effect of these four peptides (Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] and LL-37). Herein, Ctn and short derived peptides were tested against epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* Y strain (benznidazole-resistant strain) and cytotoxicity on mammalian cells were evaluated toward LLC-MK2 lineage. Ctn inhibited all *T. cruzi* developmental forms, including amastigotes, which is implicated in the burden of infection in the chronic phase of Chagas' disease. Moreover, Ctn showed a high selective index to trypomastigote forms (> 200). Ctn induced cell death in *T. cruzi* through necrosis, as determined by flow cytometry analyses with specific molecular probes and morphological alterations, such as loss of membrane integrity and cell shrinkage, as observed by scanning electron microscopy (SEM). In the in vivo test, an acute toxicity assessment by the Up-and-Down method showed that Ctn did not promote hematological, biochemical and did not cause damage to animal organs. Altogether, Ctn appears as a promising template for the development of antichagasic agents.

Key words: Crotalicidin; Viperacidin; *Trypanosoma cruzi*; Chagas' disease; Antimicrobial peptide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia das formas evolutivas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> - epimastigota (A); tripomastigota (B) e amastigota (C).....	20
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3 – Manifestações clínicas provenientes das principais portas de entrada do <i>T. cruzi</i> no organismo: a conjuntiva ocular originando o sinal de Romaña (A) e a pele provocando o chagoma de inoculação (B)	22
Figura 4 – Distribuição dos casos de Doença de Chagas no mundo	26
Figura 5 – Modelos de mecanismos de ação antimicrobianos membranolíticos de PAMs.....	30
Figura 6 – Modelos de mecanismos de ação antimicrobianos de PAMs que agem intracelular.....	31
Figura 7 – Análise filogenética de catelicidinas de vertebrados	34
Figura 8 - Estrutura de Ctn e fragmentos após dissecação <i>in silico</i>	35
Figura 9 - Citometria de fluxo de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com Benzonidazol (218µM) e marcadas com Anexina e 7-AAD. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.....	53
Figura10 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com BZ (218µM) e marcadas com DCF durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.....	53
Figura11 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com BZ (218µM) e marcadas com Rho 123 durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.....	54
Figura12 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com BZ (218µM) e marcadas com Laranja de acridina durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo	54
Figura 13 – Efeito citotóxico de Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] sobre a linhagem celular LLC-MK ₂ após 24 h de tratamento, comparados ao grupo controle não tratado.....	56
Figura 14 – Efeito citotóxico de Ctn sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.....	58
Figura 15 – Efeito citotóxico de Ctn[1-14] sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.....	59

Figura 16 – Efeito citotóxico de Ctn[15-34] sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.....	60
Figura 17 – Efeito citotóxico de LL-37 sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.....	61
Figura 18 - Efeito citotóxico de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 sobre a forma tripomastigota de <i>T.cruzi</i> após 24h de tratamento.....	63
Figura 19- Efeito da crotalidina sobre células LLC-MK2 infectadas com a forma amastigota intracelular de <i>T. cruzi</i>	65
Figura 20 - Citometria de fluxo de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com crotalidina (4,47uM) e marcadas com Anexina e 7AAD.....	67
Figura 21 - Potencial necrótico de Crotalidina em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> marcadas com Anexina e 7-AAD através de Citometria de fluxo.....	67
Figura 22 - Histograma representativo do sinal fluorescente de rodamina 123 de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com crotalidina (4,47 µM) durante 24 horas.....	68
Figura 23 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com crotalidina (4,47 µM) e marcadas com Rho123 durante 24 horas.....	69
Figura 30 - Histograma representativo do sinal fluorescente de DCFH-DA de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com crotalidina (4,47µM) durante 24 horas.....	69
Figura 31 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com crotalidina (4,47µM) e marcadas com DCF durante 24 horas.....	70
Figura 32 - Fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> marcadas com laranja de acridina e tratados com crotalidina (4,7µM) durante 24 horas.....	71
Figura 33 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com crotalidina (4,47µM) e marcadas com Laranja de acridina durante 24 horas.....	71
Figura 34 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de <i>T.cruzi</i> não tratadas após 24h de incubação.....	72
Figura 35 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de <i>T.cruzi</i> tratadas com crotalidina (4,47µM) após 24h.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura primária, carga, hidrofobicidade e massa molecular de Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34] e LL-37	42
Tabela 2 –Efeito do Benzonidazol sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de T. cruzi, células de mamíferos LLC-MK2 e seu respectivo índice de seletividade parasitário	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DC	Doença de Chagas
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
IgG	Imunoglobulina G
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
ECG	Ecocardiograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
hCAP	Proteína antimicrobiana catiônica humana
N	Nitrogênio
C	Carbono
LNDT	Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais
LLC-MK2	Células epiteliais renais de macaco
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
LIT	Meio Liver infusion tryptose
SDS	dodecil sulfato de sódio
7-AAD	7-Amino Actinomicina D
Anexina-V	Anexina V- ficoeritrina
Rho	Rodamina 123
BZ	Benzonidazol
IC50	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
EPM	Erro Padrão Médio
SBF	Soro bovino fetal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
IS	Índice de seletividade

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Doença de Chagas	18
1.2 Ciclo Biológico e fisiopatologia da Doença de Chagas.....	19
1.3 Epidemiologia da Doença de Chagas	24
1.4 Tratamento da Doença de Chagas	26
1.5 Peptídeos Antimicrobianos.....	29
1.5.1 Peptídeos Antimicrobianos em humanos.....	33
1.5.2. Catelicidinas vipericina.....	33
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Substâncias e locais de estudo	42
4.2 Estudos <i>in vitro</i> do efeito antichagásico dos PAMs	43
4.2.1 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> de Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34] e LL-37.....	43
4.2.2 Atividade tripanocida <i>in vitro</i> dos peptídeos em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	44
4.2.3 Atividade tripanocida <i>in vitro</i> dos peptídeos em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	44
4.2.4 Atividade tripanocida <i>in vitro</i> dos peptídeos em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	45
4.2.5 Potencial necrótico e/ou apoptótico de Ctn em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	46
4.2.5.1 Potencial necrótico e/ou apoptótico de Ctn em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	46
4.2.5.2 Alteração do potencial transmembrânico mitocondrial induzido por Ctn em <i>T. cruzi</i>	46
4.2.5.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por Ctn em <i>T. cruzi</i>	47
4.2.5.4 Indução de autofagia induzida por Ctn em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	47
4.2.5.5 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais induzidas por Ctn em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	48
4.4 Análise de dados	50
5. RESULTADOS	51
5.1. Atividade anti <i>T. cruzi</i> do Benzodidazol	52
5.2 Estudos <i>in vitro</i> do efeito antichagásico dos PAMs	55
5.2.1 Atividade citotóxica de Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] <i>in vitro</i> sobre células LLC-MK2.....	55
5.2.2 Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	57
5.2.3 Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	62

5.2.4	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de Ctn em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	64
5.2.5	Potencial necrótico e/ou apoptótico da Crotalidina	66
5.2.5.1	Potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da Crotalidina.....	66
5.2.5.2	Potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da Crotalidina	68
5.2.5.3	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por Crotalidina.....	69
5.2.5.4	Indução de autofagia induzida por Crotalidina	70
5.2.5.4	Alterações morfológicas ultraestruturais induzidas por Crotalidina em <i>T. cruzi</i>	71
6.	DISCUSSÃO	73
7.	CONCLUSÃO	84
6.	REFERÊNCIAS	86
7.	APÊNDICE	99

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) compõe o grupo das 13 doenças tropicais negligenciadas (DTNs), definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que possuem como característica comum maior prevalência em regiões pobres do planeta, geralmente acompanhadas de clima tropical ou subtropical. Estas doenças acarretam um impacto social e econômico sobre as populações mais pobres da África, Ásia e América Latina causando cerca de 534.000 mortes por ano, além de tornar aproximadamente 57 milhões de indivíduos incapacitados (CHATELAIN *et al.*, 2017; CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010; WHO, 2015).

Em 1909, o pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas tornou-se único na história da medicina por descrever a sequência de eventos e todo o ciclo biológico de uma doença até então desconhecida, a Doença de Chagas (DC). Chagas trabalhava no combate à Malária no interior do estado de Minas Gerais compondo a equipe de pesquisadores de Osvaldo Cruz (LEWINSOHN, 1979; MONCAYO, 2010). Informado sobre a grande quantidade de insetos hematófagos na região e de sua proliferação em moradias humanas, o médico sanitário decidiu analisar o conteúdo do intestino médio dos insetos e descobriu, acidentalmente, a presença de um parasita flagelado. O passo seguinte foi verificar que, após contato com o inseto, crianças desenvolviam mesmo quadro clínico com a presença de um protozoário semelhante ao encontrado no inseto. Em homenagem ao seu tutor, Chagas nomeou o parasito de *Trypanosoma cruzi* (LEWINSOHN, 1979; MONCAYO, 2010). Dois anos mais tarde, o relatório completo de Carlos Chagas já continha descrições das características clínicas da doença no homem, ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros intermediários e definitivos, além de dados epidemiológicos locais (LEWINSOHN, 1979).

Atualmente se sabe que o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) também infecta mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e selvagens e pode ser transmitido por mais de 150 espécies de triatomíneos, insetos popularmente conhecido como “barbeiro”, que são o principal transmissor da infecção para os seres humanos. O inseto normalmente reside

em paredes e telhados de casas mal construídas, em áreas rurais e periurbanas em toda a América Latina (MONCAYO, 2010; WHO, 2015).

O agente etiológico da doença de Chagas é um parasito da ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae; gênero *Trypanosoma*; espécie *Trypanosoma cruzi* (DIAS; COURA, 1997). Os tripanosomídeos exibem organelas eucarióticas típicas como membrana plasmática, retículo endoplasmático, e complexo de Golgi. No entanto, algumas estruturas particulares permitem sua identificação.

Dentre as características principais do *T. cruzi* estão à presença de um flagelado único e um cinetoplasto volumoso, contendo DNA (k-DNA) localizado na mitocôndria. A presença dessa organela auxilia na identificação do parasito, uma vez que o cinetoplasto excede os limites da membrana parasitária, tornando-se visível e constitui 20-25% do total de DNA da célula (DIAS; COURA, 1997; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

O papel desempenhado pelo k-DNA não é bem conhecido, ainda que sua presença seja essencial à viabilidade dos estágios evolutivos do *T. cruzi* (DIAS; COURA, 1997; LIU; ENGLUND, 2007). Na última década, pesquisas envolvendo o metabolismo mitocondrial e a atividade do K-DNA como alvo terapêutico da doença de Chagas foram realizadas. A presença de uma via alternativa de oxidação (AOX) foi recentemente descoberta e representa um alvo promissor, uma vez que constitui uma defesa antioxidante para os tripanosomídeos no processo de infecção ao hospedeiro (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

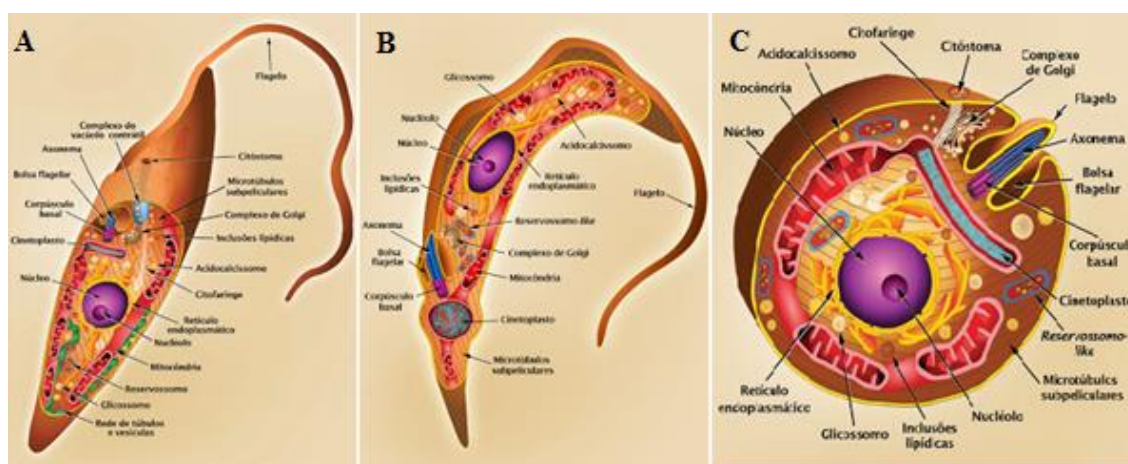
1.2 Ciclo Biológico e fisiopatologia da Doença de Chagas

O ciclo biológico do *T. cruzi* é heteroxênico - o parasito multiplica-se no meio intracelular do hospedeiro vertebrado mamífero e no meio extracelular do inseto vetor triatomíneo (CLAYTON, 2010; RASSI et al., 2010).

Ao ser ingerido pelo vetor, o *T. cruzi* passa por uma sequência irreversível de transformações que se iniciam ao longo do tubo digestivo do inseto hematófago (CLAYTON, 2010). A posição do cinetoplasto e a localização do flagelo identificam morfologicamente as três formas evolutivas do *T. cruzi* (Figura 1).

Nos epimastigotas (formas de multiplicação do parasito no intestino do inseto) o cinetoplasto e a bolsa flagelar, da qual emerge o flagelo, estão em posição anterior ao núcleo. No tripomastigota (estágio infectante do parasito) o cinetoplasto situa-se na parte terminal do flagelo. Já nos amastigotas (estágio evolutivo de multiplicação intracelular no hospedeiro definitivo), o flagelo é imperceptível e não proeminente (DIAS; COURA, 1997).

Figura 1. Morfologia das formas evolutivas do parasito *Trypanosoma cruzi* - epimastigota (A); tripomastigota (B) e amastigota (C).



Fonte: adaptado do site CDC, disponível em www.dpd.cdc.gov. Acessado em: 07/2017

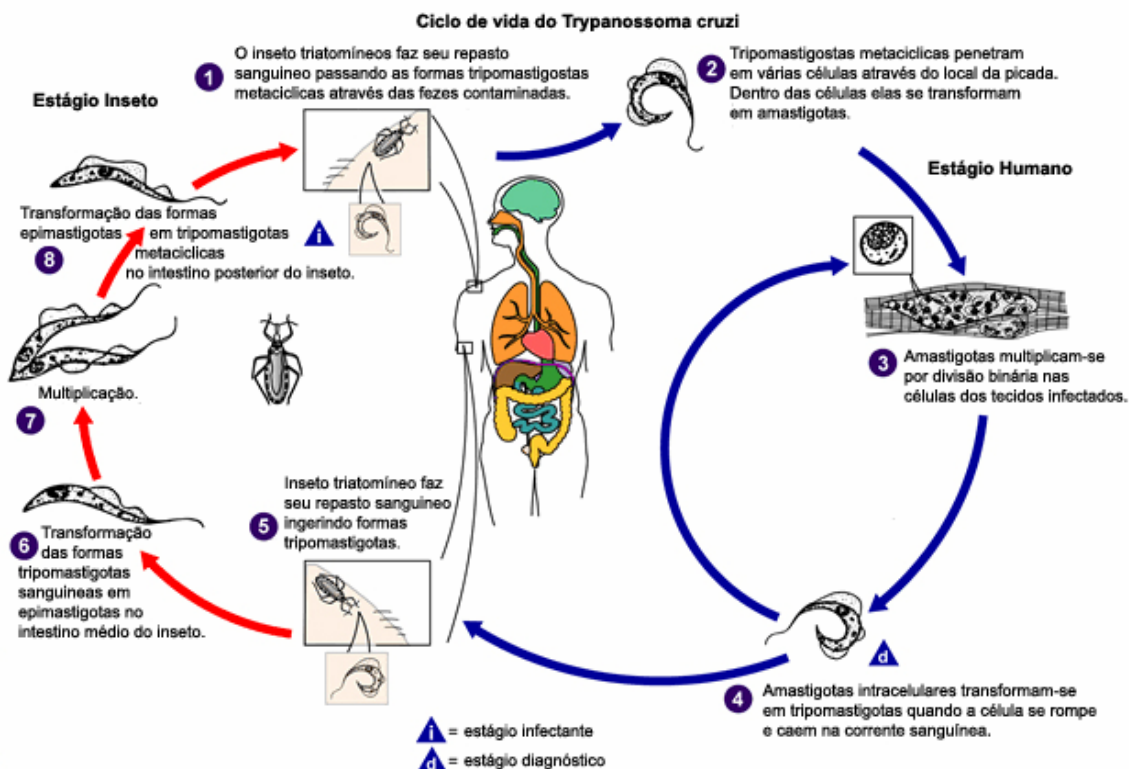
O inseto vetor se infecta ao se alimentar de sangue em um vertebrado infectado. A forma tripomastigota obtida a partir do sangue desse vertebrado começa a sofrer transformações no estômago do inseto e evolui para a forma epimastigota. Nessa fase, o parasito multiplica-se intensamente e povoa quase que a totalidade do intestino médio e posterior do barbeiro. Parte desses epimastigotas migra para o intestino posterior onde se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectante para várias espécies de mamíferos (RASSI, et al., 2010; SCHMUNIS; BRENER; ANDRADE, 2000).

O próximo repasto do barbeiro infectado acontece com a liberação das fezes do inseto e, juntamente com elas, a forma tripomastigota metacíclica e uma substância irritante que ocasiona prurido na pele do vertebrado. A irritação local faz com que os

tripomastigotas metacíclicos sejam arrastados para o orifício da picada pelo próprio hospedeiro vertebrado e penetrem na corrente sanguínea (CASTRO *et al.*, 2007; RASSI, et al., 2010).

Uma vez no interior das células humanas, as formas tripomastigotas metacíclicas assumem a forma amastigota que se multiplica por divisão binária após um período médio de latência que varia entre 20 e 30 horas. As formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas que rompem as células hospedeiras (em intervalos aproximados de 12 horas) e atingem a corrente sanguínea infectando assim novas células. Nesse período pode ocorrer ingestão de formas tripomastigotas por triatomíneos, reiniciando assim, o ciclo da DC (Figura 2) (RASSI, et al., 2010; SCHMUNIS; BRENER; ANDRADE, 2000).

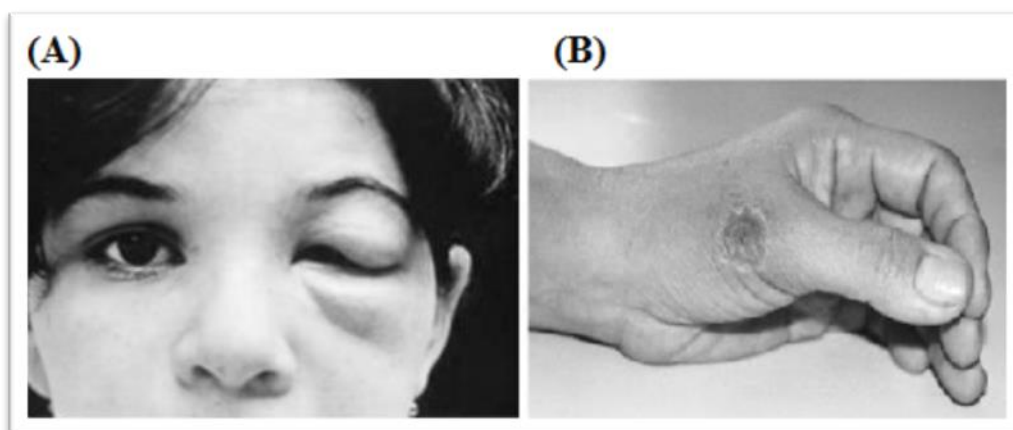
Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: adaptado do site CDC, disponível em www.dpd.cdc.gov. Acessado em: 07/2017

Em aproximadamente 50% dos casos, a infecção ocorre através da penetração de entrada dos parasitos a conjuntiva ocular (sinal de Romaña) o que facilita o diagnóstico, devido ao evidente edema das pálpebras em um dos olhos que é clinicamente indolor e associado de linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (figura 3A). O edema pode se estender por toda a face até causar oclusão total da fenda palpebral. O fácil reconhecimento do sinal de Romaña tornou-o um excelente fator de diagnóstico de fase aguda da doença de Chagas. Outra porta de entrada comum do parasito é a pele. A lesão cutânea provocada pelo repasto do inseto assume forma endurecida, dolorosa e avermelhada – o chagoma de inoculação (Figura 3B) (KINOSHITA-YANAGA et al., 2009; SCHMUNIS; BRENER; ANDRADE, 2000).

Figura 3. Manifestações clínicas provenientes das principais portas de entrada de infecção por *T. cruzi* no organismo.



Legenda: (A) edema inflamatório unilateral das pálpebras originando o sinal de Romaña e (B) lesão indolor na pele: chagoma de inoculação.

Fonte: Modificado de KINOSHITA-YANAGA et al, 2009.

A fisiopatologia da doença de Chagas pode progredir de duas formas: (i) com o aumento exponencial do número de tripomastigotas circulantes e de células parasitadas, caracterizando a fase aguda da doença, ou (ii) a partir de um controle gradativo do sistema imune à proliferação parasitária, dando origem à fase crônica da doença que acomete cerca de um terço dos indivíduos infectados (BONNEY; ENGMAN, 2001; COURA et al., 1997; SCHMUNIS; BRENER; ANDRADE, 2000).

Durante a fase aguda da DC, as manifestações clínicas são raras e desaparecem espontaneamente após 12 semanas, aproximadamente. O paciente evolui para a fase

crônica ou progride para a morte. Em geral, sintomas inespecíficos como febre, edema facial, mal estar acompanhado de linfadenopatia e hepatoesplenomegalia podem ser relatados. Devido à alta parasitemia durante essa fase, o parasito pode ser facilmente visualizado através do exame de sangue direto. As manifestações clínicas digestivas são, na maioria das vezes, discretas e, praticamente, imperceptíveis (DIAS; COURA, 1997; RASSI, et al., 2010). Cerca de 5 a 10% das pessoas infectadas evoluem para o óbito ainda na fase aguda, geralmente crianças que cursam com miocardites ou mieloencefalites (CHATELAIN, 2017; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Aproximadamente dois meses após o início da fase aguda, apenas uma pequena quantidade de *T.cruzi* encontra-se circulante na corrente sanguínea, o que caracteriza o início da fase crônica da doença que pode ser subdividida em indeterminada, cardíaca e digestiva (RASSI, et al., 2010).

Com a redução das formas tripomastigotas do sangue, a forma indeterminada, inaparente ou assintomática inicia-se. É a forma clínica de maior prevalência, uma vez que a incidência da doença de Chagas no Brasil vem diminuindo e o manejo clínico dos pacientes vem melhorando. Apresenta um caráter benigno com baixo potencial evolutivo em curto e médio prazos, devido um equilíbrio entre o sistema imunológico do hospedeiro e o potencial de infectividade do parasito revelado laboratorialmente pelo aumento de anticorpos da classe IgG (BRASIL, 2016; RASSI, et al., 2010).

Apesar do bom prognóstico, em um período de 10 a 25 anos pós-contágio, cerca de 15% a 30% dos infectados indeterminados irão desenvolver uma fase sintomática, com danos aos órgãos, representada por complicações no sistema cardiovascular e/ou digestório – o que caracteriza as formas cardíacas e digestivas da doença de Chagas (COURA, 2007; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

A forma cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica - CCC) é a forma clínica sintomática mais prevalente da doença de Chagas, caracterizada inicialmente por três síndromes principais: arritmia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo, acarretando assim elevada morbimortalidade. Um infiltrado inflamatório causa morte celular e fibrose intersticial do tecido cardíaco que levam a distúrbios no sistema de condução cardíaca, redução da contratilidade e risco aumentado de morte súbita. O ecocardiograma evidencia cardiomegalia, que está diretamente ligada ao prognóstico do

paciente. Tendo como referência o ECG, é possível estabelecer o grau de comprometimento cardíaco e a rotina de avaliação do portador de cardiopatia chagásica (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; HAMERS et al., 2016; RASSI, et al., 2010).

A forma digestiva acomete principalmente o esôfago e intestino grosso. Sintomas como disfagia, soluços, salivação aumentada e constipação provocam dificuldade na alimentação. As complicações digestivas acontecem em decorrência de lesões do sistema nervoso autônomo ao longo de todo o trato gastrointestinal (sistema nervoso entérico) com atrofia do plexo mioentérico que leva a perda de coordenação motora e favorece o desenvolvimento do megaesôfago e megacólon (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI et al., 2012). Atualmente, cerca de 300.000 indivíduos no Brasil apresentam a forma digestiva com presença de megacólon e os principais sintomas relatados são constipação e impactação fecal, dor abdominal, vôlvulo, obstruções e até perfurações intestinais (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

A forma clínica que será desenvolvida, assim como a gravidade da doença de Chagas no paciente estarão relacionadas à resposta imune desencadeada, à diversidade genética do *T. cruzi* e a constituição genética do inseto vetor (HAMERS et al., 2016; RASSI et al., 2012). As principais causas de mortalidade em pacientes chagásicos são insuficiência cardíaca progressiva (70%) e morte súbita (30%) (CHATELAIN, 2017).

1.3 Epidemiologia da Doença de Chagas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 7-8 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo *T. cruzi*, principalmente nas áreas endêmicas de 21 países da América Latina, onde a doença de Chagas acomete atualmente 5,7 milhões de pessoas (WHO, 2013; ANDRADE et al., 2015).

A DC constitui a doença parasitária mais importante na América Latina onde cerca de 14 mil pacientes chegam ao óbito por ano (índice superior ao da malária) agravando os impactos sociais e econômicos nessa região (WHO, 2013). Países como Argentina, Brasil e México são mais endêmicos com cerca de 13% da população vivendo sob risco de contrair a doença e maior número estimado de pessoas infectadas

por habitantes. No Brasil, dados apontam que 1.156.821 pessoas estejam infectadas pelo *T. Cruzi* (WHO, 2015).

O impacto econômico mundial gerado pela doença de Chagas chega a US\$ 7,19 bilhões por ano (MORILLA; ROMERO, 2015). Somente no Brasil, US\$ 1,3 bilhões são gastos anualmente com pacientes em fase crônica da DC (WHO, 2016).

O perfil epidemiológico da doença de Chagas no Brasil, porém, vem se modificando como resultado de transformações socioculturais. A transmissão vetorial, que era principal causa das infecções pelo *T. cruzi* na década de 70 sofreu uma redução expressiva (46 casos) quando comparada à transmissão congênita (571 casos) (WHO, 2015). Essa inversão de transmissão deve-se às ações de controle químico que foram realizadas como políticas de saúde pública a partir de 1975 através da extinta Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (Sucam), reduzindo assim o número de insetos vetores do parasita (RAMOS; ALBERTO; CARVALHO 2001).

Entre os anos de 2000 e 2009, foram registrados 945 casos de doença de Chagas aguda com maior frequência na região da Amazônia Legal e alguns registros em estados como Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo. A taxa de letalidade no período foi de 2% e a transmissão vetorial correspondeu somente a 16 casos (2%) com prevalência de pacientes do sexo masculino (52%) (BRASIL, 2010).

As metas da OMS para o controle e eliminação da doença de Chagas baseiam-se em dois pilares: a interrupção da transmissão e a prestação de cuidados a pacientes em fase crônica. Dentre os esforços para combater a doença estão: (i) a interrupção da transmissão vetorial intradomiciliar (principalmente na América Latina) e (ii) interrupção da transmissão entre dois pacientes (por via congênita, através de transfusões de sangue e transplantes de órgãos) (WHO, 2013).

Uma revisão publicada recentemente avalia as mudanças no perfil clínico, terapêutico e nos padrões de transmissão da doença de Chagas no Brasil nos últimos anos. Os autores apontam para um êxito no controle à doença demonstrando que a prevalência de infecção por *Trypanosoma cruzi* que era estimada em mais de 5% entre crianças de áreas endêmicas durante a década de 1960, diminuiu para menos de 2% nos anos 1990 e na década passada chegou a 0,1%. Essa nova realidade, reafirma também a

DC como uma condição crônica para a qual novos ensaios clínicos visando mais segurança e eficácia terapêutica são de fundamental importância (DIAS et al.,2016).

Figura 4. Distribuição dos casos de doença de Chagas no mundo



Fonte: WHO, 2015.

1.4 Tratamento da DC

A doença de Chagas representa um problema de saúde pública com altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas e, embora as consequências da DC causem grande impacto econômico mundial, ainda não existe um tratamento eficaz na fase crônica (CHATELAIN, 2017).

Desde o início da década de 70, dois medicamentos antichagásicos têm sido amplamente utilizados: o Nifurtimox e o Benzonidazol (BZ). Estes fármacos, além de serem pouco específicos, apresentam alta toxicidade e efeitos colaterais que diminuem a adesão ao tratamento como: perda de peso, vômitos, febre, dores musculares e nas articulações, entre outros (COURA; CASTRO, 2002, MAYA et al., 2007). Vale

ressaltar ainda a necessidade de emprego destas medicações em esquemas posológicos prolongados, durante pelo menos 60 dias (COURA et al, 1997).

O Nifurtimox (produzido em 1967) teve sua comercialização proibida em diversos países, incluindo o Brasil, devido sua toxicidade (CANÇADO, 2002). Sendo assim, o Benzonidazol (adotado a partir de 1972) é o único tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde; para tratamento da DC (MORILLA; ROMERO, 2015).

Em 2003 a Roche[®], até então fabricante do medicamento, iniciou processo de transferência de tecnologia do BZ para o governo brasileiro. O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) ficou responsável pela sua produção e em 2012 os pesquisadores desenvolveram uma formulação pediátrica do medicamento.

Acredita-se que o mecanismo de ação do benzonidazol envolve a ligação de seus intermediários a vários componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos do *T. cruzi*, causando stresse oxidativo e provocando assim a inibição do crescimento dos parasitos (BOVERIS et al., 1980; WILKINSON et al., 2008). A modificação covalente de macromoléculas do parasito através de espécies reativas geradas durante o metabolismo nitroreductor do BZ parece ser determinante, uma vez que a sensibilidade dos parasitos as EROs é vital. Aparentemente, o *T. cruzi* possui níveis reduzidos de enzimas antioxidantes como a glutathiona reduzida e, portanto, capacidade limitada de detoxificar EROs, produzidos após contato com o BZ (BOVERIS et al., 1980; RAJÃO et al., 2014)

A interação dessas espécies reativas com DNA, proteínas, lipídios e outros componentes celulares promovem seus efeitos quimioterápicos não só contra o *T. cruzi*, mas também são responsáveis pelos efeitos adversos do tratamento no homem (CASTRO et al., 2006; PEDROSA et al. 2001).

Além das reações adversas, o tratamento é eficaz apenas no início da fase aguda da infecção (MORILLA; ROMERO, 2015). Uma vez que a doença tenha progredido até as formas indeterminada ou crônica, nenhum medicamento apresenta efetividade satisfatória. O índice de cura entre casos agudos e recentes é de 80%, enquanto para pacientes chagásicos crônicos esse percentual é inferior a 20% (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SESTI-COSTA et al., 2014). Em pacientes com cardiopatia chagásica,

66% dos indivíduos apresentam o parasito ainda no sangue, demonstrando a baixa eficácia do medicamento mesmo após 5 anos de terapia (HAMERS et al., 2016). O tratamento é ainda contra indicado durante a gravidez e em pacientes com insuficiência renal ou hepática (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Existem cepas naturalmente resistentes ao benzonidazol e mesmo após 40 anos de pesquisa, os mecanismos de resistência ainda permanecem discutíveis. Um estudo defende a nitroredutase de tipo I (NTR) dependente de NADH como principal fator para explicar os baixos índices de cura detectados em pacientes chagásicos tratados. Tanto o BZ como o nifurtimox seriam ativados por essa enzima mitocondrial. A regulação negativa explicaria como a resistência pode surgir. A perda de uma única cópia deste gene em *T. cruzi*, seja através da seleção de medicamentos *in vitro* ou por mutação aleatória, seria suficiente para causar resistência às drogas nitroheterocíclicas (WILKINSON et al., 2008).

Tais razões justificam a urgência na busca por novos alvos terapêuticos para a DC com maior eficácia, seletividade e menores complicações clínicas (CHATELAIN, 2017; WHO, 2016).

Os produtos naturais e seus derivados têm sido tradicionalmente a fonte mais comum na obtenção de fármacos (KIRKPATRICK, 2002). Pesquisas com substâncias de origem animal têm atraído considerável interesse como potencial fonte de futuros agentes terapêuticos, uma vez que possuem estruturas com grande diversidade química, especificidade bioquímica, e outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novos fármacos (ALTMANN, 2001; COSS, 2006).

Venenos provenientes de serpentes demonstraram atividade antiparasitária (TORRES et al., 2010; TEMPONE et al., 2001; MENEZES et al., 2012). O veneno de *Bothrops lutzi* e *Bothrops leucurus* mostraram efeito sobre formas promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* (TORRES et al., 2010; MENEZES et al., 2012). O veneno de *B. jararaca*, também inibiu o crescimento de *T. cruzi* (GONÇALVES et al., 2002).

1.5 Peptídeos Antimicrobianos como fonte de novos fármacos tripanocidas

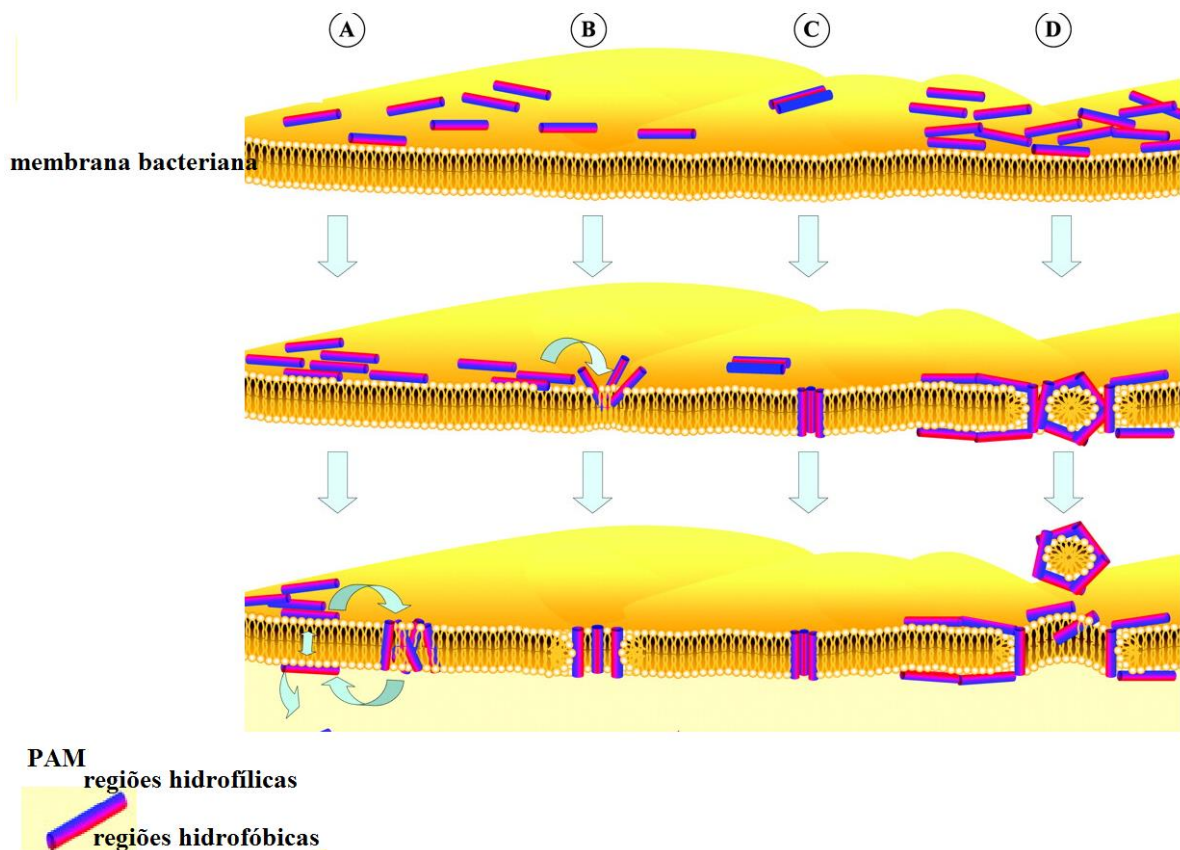
Os Peptídeos Antimicrobianos (PAM) são um grupo heterogêneo de proteínas de natureza pequena, catiônica e anfipática, em sua maioria. Os PAMs provavelmente representam um dos primeiros mecanismos evolutivos que conferem defesa antimicrobiana, antiprotozoária e antifúngica, além de propriedades imunomoduladoras e estão presentes em diversos tipos de plantas e animais incluindo o homem (REINHOLZ; RUZICKA; SCHAUBER, 2012; MAJEWSKI; MARCINKIEWICZ, 2016). Os PAMs são peptídeos pequenos que contem menos de 50 aminoácidos, catiônicos, anfipáticos e resistentes à ação de outras drogas (KANG et al., 2014).

A produção desses peptídeos em diversas espécies de animais ou vegetais pode ser fisiológica ou induzida a partir de algum estímulo inflamatório infeccioso com finalidade de proteção. Os PAMs conseguem desempenhar sua ação antimicrobiana de amplo espectro devido sua facilidade de interagir com membranas celulares de diversos microrganismos (KANG et al., 2014).

A resistência bacteriana aos antibióticos surge como um problema mundial e justifica a emergência de PAMs com interesse clínico. Essa via de resistência pode acontecer através de diversas rotas: (i) inibição da interação fármaco-alvo; (ii) modificação do local de ligação ao fármaco em proteínas alvo (iii) desenvolvimento de bombas de efluxo pelas células alvo; (iv) mutações genéticas; etc. A maioria dos PAMs, entretanto, devido sua natureza anfipática, atuam diretamente na membrana do patógeno evitando os mecanismos de evasão microbiana e tornando essa resistência mais difícil (KANG et al., 2014).

As propriedades catiônicas dos peptídeos propiciam uma interação seletiva com as superfícies carregadas negativamente das membranas microbianas. Então, suas porções hidrofóbicas são responsáveis pela interação com componentes hidrofóbicos da membrana. A partir dessa interação, ocorrem rearranjos estruturais que resultam na translocação do peptídeo através da membrana e na interação com alvos intracelulares ou no mecanismo mais comum, um efeito membranolítico. Esse mecanismo de ação tão característico permite que os PAMs evitem as vias de resistência comuns observadas para antibióticos que já estão disponíveis no mercado (Figura 5) (SEO et al., 2012; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

Figura 5 – Modelos de mecanismos de ação antimicrobianos membranolíticos de PAMs.

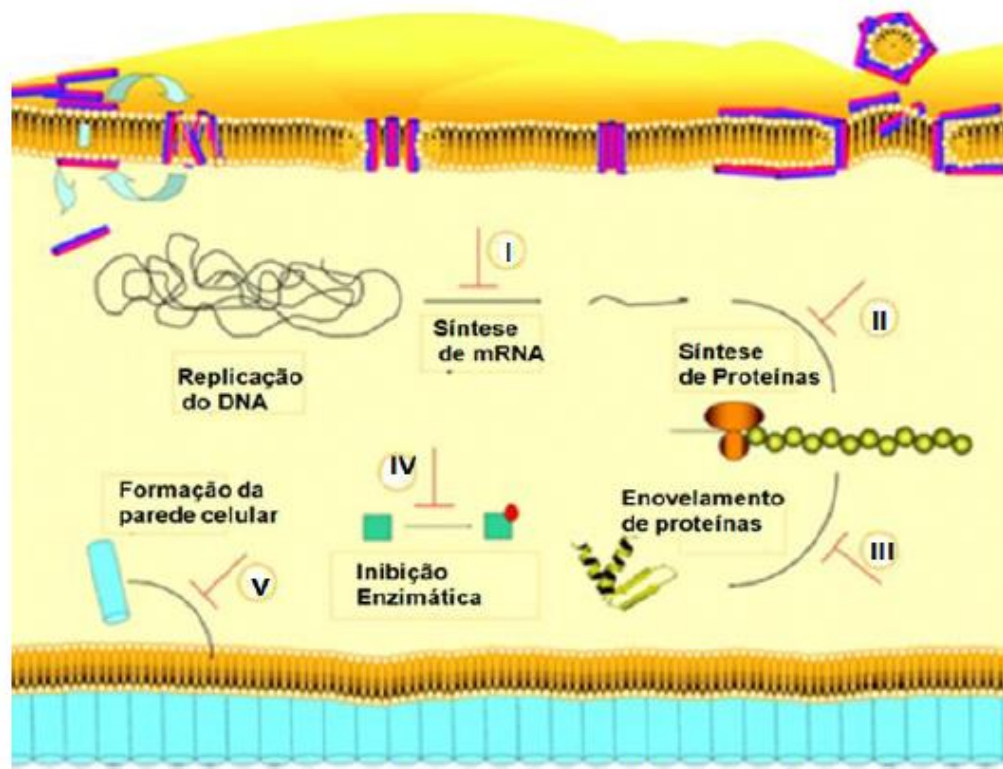


Legenda: No modelo "agregado", os peptídeos penetram a membrana como um agregado semelhantes a micelas, porém sem adotar nenhuma orientação específica (A). O modelo de "poro" (B) propõe que os PAMs se inserem perpendicularmente na bicamada com as regiões hidrofílicas associadas às cabeças fosfolipídicas enquanto as regiões hidrofóbicas se associam ao núcleo lipídico. No modelo "Cilindro" (C), os peptídeos penetram na bicamada em formato de "barril", com as regiões hidrofílicas voltadas para o lúmen do poro e as regiões hidrofóbicas em contato com a bicamada lipídica. O modelo de "tapete" propõe que os PAMs se agreguem paralelamente à bicamada lipídica, semelhante a um "tapete" (D). A partir de uma concentração mínima, esses PAMs desenvolvem uma atividade membranolítica semelhante ao detergente, com formação de micelas e poros da membrana.

Fonte: Adaptado de JENSSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006.

Apesar dos modelos citados acima serem os mais relacionados à atividades antimicrobianas, os PAMs também podem interagir com alvos intracelulares (figura 6).

Figura 6 – Modelos de mecanismos de ação antimicrobianos de PAMs que agem intracelular.



Legenda: PAMs podem agir de forma a inibir a síntese de RNAm (I); bloqueando a síntese proteica de micro-organismos (II); dificultando o enovelamento conformacional das proteínas (III); ligando-se irreversivelmente às enzimas (IV) ou ainda na formação da parede celular que é imprescindível ao micro-organismo.

Fonte: MELO, 2014 *apoud* JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006.

Estudos demonstraram que PAMs funcionam também como moléculas efetoras do sistema imune sendo capazes de potencializar a fagocitose, estimular a liberação de prostaglandina, promover a neutralização de antígenos e induzir a quimiotaxia de várias células imunes em focos inflamatórios – são os “host defense-peptídeos” (ELSBACH, 2003; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Os PAMs são classificados de acordo com sua estrutura: α -helicoidais; em folha β ; estendidos e em *loop*. Os peptídeos α -helicoidais compõe a classe mais bem descrita

dos PAMs. Suas relações estrutura-atividade estão, em sua maioria, bem definidas e eles penetram nas membranas bacterianas seguindo os modelos de poro, barril ou tapete. Os PAMs em folha β , como as β -defensinas e protegrina possuem estruturas rígidas devido suas pontes dissulfureto. A maioria desses PAMs também exerce sua atividade antimicrobiana por inserção na membrana bacteriana pelo modelo de agregado ou poro. Os PAMs em estrutura estendida são predominantemente ricos em aminoácidos específicos, como prolina, triptofano, arginina e histidina. Muitos PAMs dessa conformação não apresentam mecanismo antimicrobiano intracelular. Os peptídeos em loop apresentam uma ponte dissulfureto, são menos comuns e possuem a bactenecina como principal representante da classe com estudos clínicos avançados (SEO et al., 2012).

A composição das membranas de micro-organismos procarióticos torna-os mais sensíveis à ação dos PAMs. Uma maior densidade de carga negativas contribui para interação eletrostática entre os peptídeos e a superfície celular (SEO et al., 2012). Porém, PAMs e seus derivados sintéticos também vêm demonstrando efeitos contra células eucarióticas e atividade antiparasitários contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp (MCGWIRE; KULKARNI, 2010; MELLO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2012).

O mecanismo de ação desses peptídeos gera interesse científico devido à sua baixa propensão para o desenvolvimento de resistência por parte de micro-organismos. Na última década, o crescente surgimento de agentes patogênicos multirresistentes criou uma necessidade urgente de alternativas adequadas aos antibióticos atuais e nesse contexto vários PAMs provenientes de diferentes espécies vêm sendo estudados com possibilidades terapêuticas promissoras diante do aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos (KANG et al., 2014; SANI; SEPAROVIC; 2016).

Estudos sobre catelicidinas de outras espécies animais têm sido realizados. 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).

1.5.1 Peptídeos Antimicrobianos em humanos

Em seres humanos, os PAMs são divididos em três grandes grupos de acordo com sua natureza estrutural: as defensinas, as histatinas e a catelicidina. As defensinas são peptídeos catiônicos não glicosilados com estrutura de folha β em cadeia tripla. Nos seres humanos, podem ser encontradas duas classes de defensinas: α -defensinas e β -defensinas. O grupo das histatinas compreende peptídeos pequenos, catiônicos que estão presentes na saliva humana. O terceiro grupo compreende apenas um peptídeo - a catelicidina LL-37 (DE SMET; CONTRERAS, 2005; REINHOLZ; RUZICKA; SCHAUBER, 2012). A síntese desses peptídeos pode ser fisiológica ou induzida por citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa. (HARDER, et al., 2010).

A LL-37, única catelicidina humana identificada, é derivada proteoliticamente da extremidade C-terminal da proteína hCAP18. Apresenta uma variedade de funções imunomoduladoras, bactericida, quimiotática, indutora de neovascularização, secretora de quimiocinas, entre outras e é expressa por diferentes tipos de células, como queratinócitos, neutrófilos e mastócitos (MAJEWSKI; MARCINKIEWICZ, 2016; LEE, et al., 2017).

Entre os PAMs oriundos de animais, as catelicidinas são as mais amplamente distribuídas e abrangem desde espécies de peixes primitivos até humanos, todas com amplo espectro de atividade antimicrobiana (FALCÃO et al., 2015). Embora sejam bastante heterogêneas em suas estruturas, as catelicidinas de diferentes espécies são caracterizadas por um domínio N-terminal altamente conservado de cerca de 100 resíduos de aminoácidos. Este domínio “cathelin” de 14kD é flanqueado por um domínio de peptídeo sinal (aproximadamente 30 resíduos de comprimento) no seu terminal N e por uma região peptídica antimicrobiana no seu terminal C (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; DURR; SUDHEENDRA, 2006).

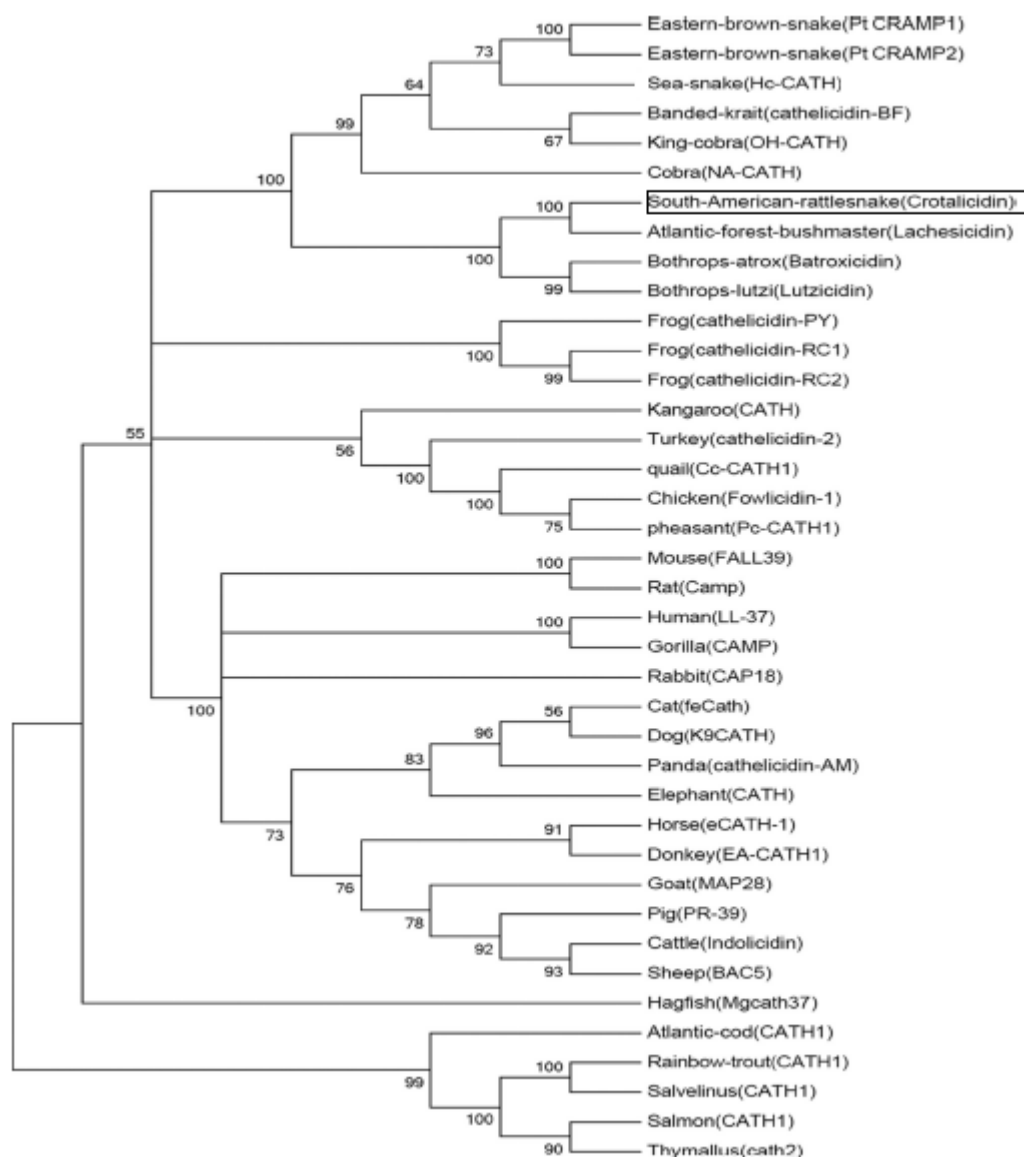
1.5.2. Catelicidinas viperícinas

Recentemente, um grupo de viperícinas (catelicidinas isoladas de serpentes) foi descoberto e caracterizado a partir do veneno de várias espécies de serpentes da América do Sul - *Bothrops atrox*, *Bothrops lutzi*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis*

muta rhombeata - e uma espécie de elapídeo - *Pseudonaja textilis* (figura 7) (RÁDIS-BAPTISTA, 2015).

Estas catelicidinas já demonstraram boa atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, baixo potencial hemolítico, efeito antifúngico contra *Candida albicans* e potencial tripanocida na doença de Chagas (CAVALCANTE et al., 2016; FALCÃO et al., 2014; MELLO et al., 2017).

Figura 7. Análise filogenética de catelicidinas de vertebrados.



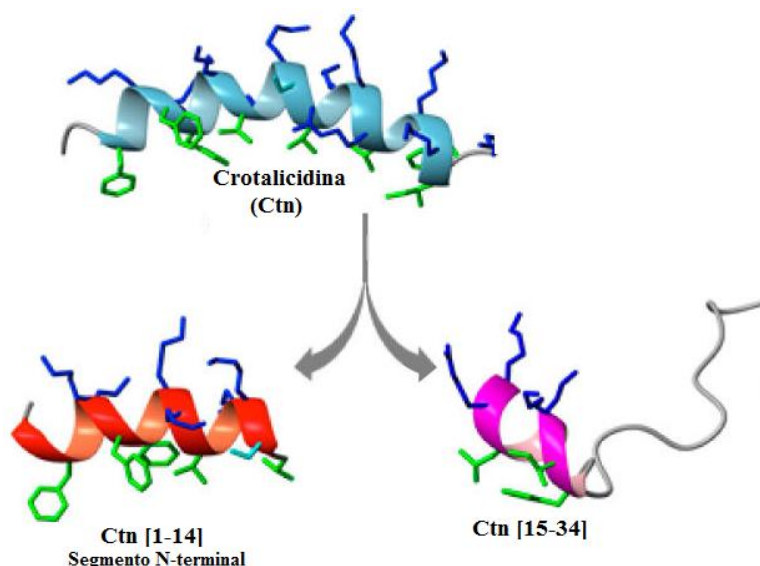
Fonte: Adaptado de Wei et al., 2015.

Dentre os peptídeos reportados, a Crotalicidina (Ctn), vipericidina isolada de *Crotalus durissus terrificus* demonstrou efeito antibacteriano (FALCÃO et al., 2014), antifúngico (CAVALCANTE et al., 2016) e antiproliferativo contra várias linhas celulares cancerígenas (FALCÃO et al., 2015) e, por isso, foi objetivo de estudo no presente trabalho.

Em estudo posterior, Ctn foi fragmentado através de dissecação in silico em dois peptídeos: Ctn[1-14] contendo os primeiros 14 aminoácidos e Ctn[15-34] contendo os demais aminoácidos (FALCÃO et al., 2015) (figura 8). A dissecação estrutura-guiada é

uma abordagem interessante para definir as regiões minimamente ativas de peptídeos bioativos. Em geral, estes componentes antimicrobianos de veneno são moléculas anfipáticas compostas principalmente por resíduos carregados positivamente (hidrofílicos) e hidrofóbicos, que podem interagir e romper as membranas celulares do parasita (MCGWIRE, KULKARNI, 2010; TEIXEIRA et al., 2012).

Figura 8. Estrutura de Ctn e fragmentos após dissecção *in silico*



Fonte: Adaptada de Falcão et al., 2015.

Embora os agentes patogênicos das plantas já tenham desenvolvido resistência aos PAM vegetais, os peptídeos de origem animal podem inibir os microrganismos mais rapidamente e com maior eficiência e por isso vêm sendo alvo de pesquisas (LEE, et al. 2017).

A partir desses indícios e cientes da necessidade de novas drogas com potencial antichagásico, o presente trabalho tem a proposta de investigar o potencial terapêutico na DC de uma catelicidina isolada a partir da serpente *Crotalus durissus terrificus* – a crotalicidina (Ctn) e seus fragmentos menores (Ctn[1-14] e Ctn[15-34]), comparando-os com a catelicidina humana LL-37.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A DC faz parte do grupo de doenças negligenciadas e acarreta impactos sociais e econômicos às populações mais pobres do mundo, onde a doença é endêmica. Os altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas tornam a DC um agravo considerável, principalmente nas formas crônicas da doença (RASSI; MARIN-NETO, 2010; WHO, 2015).

O Benzonidazol é o único tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde; para tratamento da DC e está em uso desde 1972. O fármaco além de desenvolver reações adversas graves, apresenta eficácia terapêutica que se restringe à fase aguda da doença (MORILLA; ROMERO, 2015). Pacientes que evoluem para a fase crônica e desenvolvem as principais complicações chagásicas - cardiopatia chagásica e mega colón – apresentam índice de cura extremamente reduzido (HAMERS et al., 2016).

Surge daí, a necessidade e o incentivo às novas alternativas terapêuticas para tratamento da DC que apresentem maior seletividade e melhores resultados na fase crônica da doença. Os produtos naturais e seus derivados são, tradicionalmente, a fonte mais comum na obtenção de drogas (KIRKPATRICK, 2002). Pesquisas com substâncias de origem animal têm atraído considerável interesse como potencial fonte de futuros agentes terapêuticos, uma vez que possuem estruturas com grande diversidade química, especificidade bioquímica, e outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novos fármacos (ALTMANN, 2001; CLARDY; WALSH, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão presentes em diversos seres vivos e provavelmente representam um dos primeiros mecanismos evolutivos que confere defesa antimicrobiana, antiprotozoária e antifúngica (MAJEWSKI; MARCINKIEWICZ, 2016). Recentemente, crotalidina, um PAM isolado da serpente *Crotalus durissus terrificus*, demonstrou atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral e motivou o presente estudo na busca de atividade anti *Trypanosoma cruzi* relacionada ao peptídeo (CAVALCANTE et al., 2016; FALCÃO et al., 2014; RÁDIS-BAPTISTA, 2016).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito anti *T. cruzi* da catelicidina isolada de *Crotalus durissus terrificus* (Ctn) e seus fragmentos curtos (Ctn [1-14] e Ctn [15-34]), comparando com a catelicidina humana LL-37, em culturas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a toxicidade de Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] sobre células hospedeiras de mamíferos LLC-MK2 e determinar o índice de seletividade parasitário comparando com BZ.
- Avaliar o potencial antiparasitário de Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.
- Investigar a atividade antichagásica do PAM humano LL-37 em todas as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido por Ctn em *T. cruzi* comparando com BZ.
- Avaliar a produção de EROs citoplasmático e o potencial transmembrânico mitocondrial induzido por Ctn em *T. cruzi* comparando com BZ.
- Analisar as alterações morfológicas ultraestruturais induzidas por Ctn através de microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias de estudo

Os peptídeos Crotalicidina (Ctn), Ctn [1-14] e Ctn [15-34] foram obtidas como descrito por Falcão et al. (2014, 2015). A catelicidina humana LL-37 foi sintetizada de acordo com Sorensen et al. (2001). As sequências de aminoácidos foram analisadas com os softwares "Peptide property calculator" (<http://www.pepcalc.com>) e "Heliquest" (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>) (Tabela 1). Benzonidazol (Bz) ($C_{12}H_{12}N_4O_3$, PM = 260,249 g/mol), utilizado como controle positivo, foi obtido do LAFEPE. As soluções de reserva das substâncias foram preparadas a 1000mM (1M) com PBS e mantidas a 4°C até serem utilizadas dentro de seis semanas.

Tabela 1 – Estrutura primária, carga, hidrofobicidade e massa molecular de Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34] e LL-37.

Peptídeo	Sequencia de aminoácidos	Carga ^a	Hidrofobicidade ^b	Peso Molecular ^c
Ctn	KRFKFFFKVKKSVKKRLKKIFKKPM VIGVTIPF	+16	0.263	4151.41
Ctn[1-14]	KRFKFFFKVKKSV	+9	-0.012	1797.30
Ctn[15-34]	KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	+8	0.455	2371.10
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDF LRNLVPRTES	+6	0.201	4493.26

Legenda:

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

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

c -FALCÃO et al., 2015.

4.2 Estudos *in vitro* do efeito antichagásico dos PAMs

4.2.1 Avaliação da toxicidade *in vitro* de Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34]

A atividade citotóxica de Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] sobre células de mamíferos foi realizada em células LLC-MK2 (células epiteliais renais de macaco), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

As células foram cultivadas em placas estéreis de 96 poços na concentração de 10^5 céls/mL em meio DMEM a 10% de SBF a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas para permitir a fixação das células que, posteriormente, foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos. Para determinar a viabilidade celular, realizou-se a técnica com MTT (MOSMANN, 1983), que verifica a capacidade oxirredutiva das células. Após o plaqueamento, as células foram deixadas para aderir à placa e, em seguida, foram tratadas com diferentes concentrações de Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34] (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µM) e incubadas a 37 ° C durante 24 h . O MTT (5 mg/ml em PBS) foi adicionado a cada poço e as placas foram deixadas em repouso por 4 h a 37°C. Finalmente, o precipitado de formazan foi dissolvido em 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 0,01 N de HCl. Após 17 h, leu-se a absorbância a 570 nm num leitor de microplacas (Biochrom® ASYS perito Plus). A viabilidade celular foi

calculada em comparação com um grupo controle de células não tratadas. A EC_{50} (concentração de peptídeos capazes de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. A toxicidade das drogas sobre as linhagens celulares serviu como base para definir as concentrações de trabalho dos ensaios *in vitro* e para estimar o índice de seletividade dos peptídeos.

4.2.2 Atividade tripanocida in vitro dos peptídeos em formas epimastigotas de T. cruzi

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/L) e mantidas em incubadora BOD a 28 °C. Para avaliação da atividade tripanocida dos peptídeos, foram utilizados parasitas provenientes da fase exponencial da cultura inicial.

Formas epimastigotas na concentração de 10^6 parasitas/mL foram plaqueadas e incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações de tratamento de Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34], LL-37 ou BZ. Os intervalos de concentração finais para os peptídeos foram de 1,56-100µM e para o Bz 6-192µM. A viabilidade relativa foi determinada com parasitas tratados apenas com PBS estéril em meio como controle negativos (viabilidade a 100%) e os ensaios foram realizadas em triplicata. Após os tempos de 24, 48 e 72 horas, alíquotas dos poços eram retiradas para realização da contagem de células viáveis em câmara de Neubauer (ABE, 2002; GONÇALVES et al., 2002). O percentual de viabilidade celular foi obtido calculando a concentração capaz de inibir metade do crescimento celular (EC_{50}).

4.2.3 Atividade tripanocida in vitro dos peptídeos em formas tripomastigotas de T. cruzi

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir de cultura de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2) infectadas e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido com 2% de Soro Bovino Fetal (SBF). Depois de centrifugadas e ressuspendidas na concentração de 10^6 cél/mL, os parasitos foram incubados em placas de 96 poços e tratados com diferentes concentrações de Ctn, Ctn

[1-14], Ctn [15-34], LL-37 e BZ. Neste ensaio utilizamos como controle negativo PBS estéril (pH 7.4) (ABE, 2002; GONÇALVES et al., 2002).

A viabilidade foi determinada após 24h de incubação em ambiente com 5% CO₂ e temperatura de 37°C utilizando-se a câmara de Neubauer para contagem de parasitos viáveis e posterior cálculo da EC₅₀. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

4.2.4 Atividade tripanocida in vitro dos peptídeos em formas amastigotas de T. cruzi

A partir dos resultados obtidos e por se tratar do peptídeo mais promissor, os ensaios a seguir foram continuados somente com Ctn.

Para avaliar o efeito de Ctn sobre forma amastigota, células LLC-MK₂ foram plaqueadas em lamínulas circulares estéreis em uma concentração de 5,0 x 10⁶/ml e cultivados em placas com 24 poços contendo meio DMEM e suplementação de SBF 10% em ambiente de 37°C e 5% de CO₂. Após 24h, as culturas com células já fixadas foram infectadas com as formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* na proporção de 20:1 e mantidas sob mesmas condições em meio DMEM com suplementação de 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 diferentes concentrações de Ctn por períodos de 24 e 48h. Um grupo tratado com PBS estéril foi utilizado como controle. As concentrações de tratamento da crotalicidina (0,22 e 0,44 µM) foram selecionadas a partir dos ensaios de citotoxicidade em tripomastigotas e correspondem à EC₅₀ e 2xEC₅₀ do peptídeo nas formas infectantes.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa para seguinte montagem em lâminas. Para determinar o percentual de inibição das formas amastigotas e a quantidade de células infectadas realizou-se contagem em microscópio óptico em total de 300 células por lamínula em três experimentos independentes. A atividade anti-amastigota foi expressa como: %AA = [1 - (nº amastigota/100céls) tratadas / (nº amastigota/100 céls) controle] x 100 e o índice de

sobrevivência foi determinado multiplicando a percentagem de células infectadas pelo número médio de parasitas por célula infectada (PEREZ et al., 2014).

4.2.5 Avaliação do mecanismo de morte celular induzido por Ctn em cepas Y de *T. cruzi*

A fim de inferir o mecanismo de morte induzido pela crotalicidina em *T. cruzi*, foram realizados os seguintes ensaios através de citometria de fluxo. Devido à semelhança entre as formas amastigotas e epimastigotas quanto ao cinetoplastos e a facilidade de manutenção em culturas, formas epimastigotas tornam-se mais viável para investigar a via de morte celular (GIRARD et al., 2016; SOUZA, 2002).

4.2.5.1 Potencial necrótico e/ou apoptótico de Ctn em formas epimastigotas de *T. cruzi*

A avaliação do mecanismo de morte celular induzida por Ctn foi realizada através da marcação de células utilizando os fluorocromos 7-AAD e a Anexina V.

Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídios e possui alta afinidade por fosfatidilserina (PS) na presença íons de cálcio. A exposição da PS na superfície acontece como sinal de reconhecimento para os macrófagos que expressam receptores para a proteína, promovendo assim a eliminação das células apoptóticas. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à PS podem ser detectadas por citometria de fluxo. O 7-AAD, por sua vez, se intercala ao DNA, porém não é capaz de penetrar em células com membrana íntegra. Dessa forma, células com alta marcação para 7-AAD são consideradas células necróticas, por perda de integridade de membrana (ATALE et al., 2014).

Para avaliar o mecanismo de morte exercido pela crotalicidina, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração 10^6 cels/mL e tratadas com a EC_{50} de 24h da substância ($4,47\mu\text{M}$) durante 24h. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em $100\mu\text{L}$ de PBS e por duas vezes com tampão de ligação. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em $100\mu\text{L}$ de tampão de ligação, $5\mu\text{L}$ de Ax e $5\mu\text{L}$ de 7-AAD, de acordo com as especificações do fabricante (BD Biosciences). Após 15 minutos de incubação no escuro, adicionou-se $400\mu\text{L}$ de tampão de ligação e as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur pelo detector FL2 (comprimento de fluorescência entre 563 e 606 nm).

Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

4.2.5.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Para verificar se Ctn era capaz de alterar o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) exercido pela crotalidina, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração 10^6 cels/mL e tratadas com a EC_{50} de 24h da substância ($4,47\mu\text{M}$) durante 24h. Em seguida, as células foram ressuspensas em $100\mu\text{L}$ de PBS e adicionado $5\mu\text{L}$ de solução de Rho123 ($10\mu\text{g/mL}$). Após 30 minutos de incubação no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS duas vezes. Ao final, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) pelo detector FL2. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

A Rh123 é um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias intactas, emitindo fluorescência vermelha. Alterações no potencial transmembrânico mitocondrial causam redução de íons H^+ no espaço intermembrânico, o que reduz o acúmulo do marcador. Assim sendo, alterações no $\Delta\Psi_m$ podem ser medidos através da diminuição da fluorescência em mitocôndrias lesadas (BARACCA et al., 2003).

4.2.5.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para avaliar o envolvimento do estresse oxidativo no efeito da crotalidina, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração 10^6 cels/mL e tratadas com a EC_{50} de 24h da substância ($4,47\mu\text{M}$) durante 24h. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em $500\mu\text{L}$ de PBS por 2 vezes. Após ressuspensão, foi adicionado $10\mu\text{L}$ de uma solução de DCFH-DA ($20\mu\text{M}$) por 30 minutos no escuro. Ao final, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) pelo detector FL1 (comprimento de fluorescência entre 515 a 545 nm). Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

Na presença de EROs, o DCF apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência. Dessa forma, a fluorescência observada aumenta proporcionalmente à medida que aumenta a produção de EROs pelas mitocôndrias.

4.2.5.4 Avaliação de indução de autofagia

Para avaliar se a crotalidina induz autofagia, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração 10^6 cels/mL e tratadas com a EC_{50} de 24h da substância ($4,47\mu\text{M}$) durante 24h. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em $100\mu\text{L}$ e $5\mu\text{L}$ de solução de laranja de acridina ($5\mu\text{g/mL}$). Após 15 minutos de incubação no escuro, as células foram lavadas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur pelo detector FL3. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

A laranja de acridina permite a visualização de organelas vesiculares ácidas, uma vez que é um marcador acidotrópico. Ao penetrar na célula apresenta fluorescência fica retido em organelas ácidas (característica de fagossomo) e emite fluorescência avermelhada. Essas células podem ser analisadas por citometria de fluxo (ATALE et al., 2014).

4.2.5.5 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais

Alterações na superfície dos parasitas foram determinadas 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. Com isso, detalhes da morfologia superficial dos parasitas podem ser observados.

Formas epimastigotas foram incubadas com EC_{50} de 24h da Ctn ($4,47\mu\text{M}$). Após 12 horas de incubação, os parasitas 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°C com 5% de CO_2 , cobertas com ouro e

observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (LIMA *et al.*, 2016). As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0 (MELLO *et al.*, 2017).

4.4 Análise de dados

Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicada de 3 experimentos independentes. Os resultados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão da média e os valores de EC₅₀ determinados por regressão não linear com intervalo de confiança 95%. Comparações estatísticas foram analisadas utilizando ANOVA com *Dunett's post-test* no programa GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Atividade anti *T. cruzi* do benzonidazol

Os resultados obtidos no presente trabalho serão comparados com o medicamento de escolha para tratamento da DC no Brasil – o Benzonidazol (BZ). A tabela 2 apresenta o efeito do fármaco nas três formas evolutivas do parasito (EC_{50}), assim como sua toxicidade em células LLC-MK2 e seu índice de seletividade (IS).

Tabela 2 - Efeito do Benzonidazol sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*; citotoxicidade sob células de mamíferos LLC-MK2 e índice de seletividade parasitário.

		BZ
Epimastigotas	$EC_{50}/24$ h	218.0±15
	$EC_{50}/48$ h	61.1±3
	$EC_{50}/72$ h	16.5±1
Tripomastigotas	$EC_{50}/24$ h	282 ± 20
Amastigotas	24h	282µM
	48h	564 µM
IS		2.18
LLC-MK2	$EC_{50}/24$ h	614.8 + 30

Fonte: Elaborada pelo autor

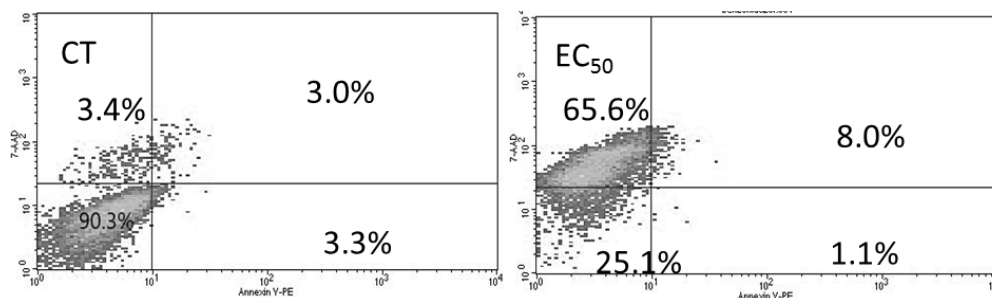
Legenda: Os valores de EC_{50} são expressos em µM.

Os dados são expressos como médias ± SEM de 3 experimentos independentes.

IS.: Índice de Seletividade

O mecanismo de morte celular induzido por BZ em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi avaliado através de citometria de fluxo. As células foram tratadas com a EC_{50} da droga em 24h (218µM) e marcadas com 7-AD/AX (Figura 9), DCFH-DA (Figura 10), rodamina (Figura 11) e laranja de acridina (Figura 12).

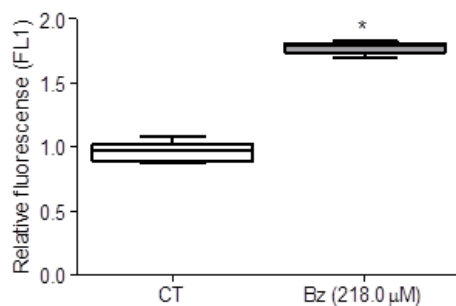
Figura 9 - Citometria de fluxo de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com Benzonidazol (218 μ M) e marcadas com Anexina e 7-AAD. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

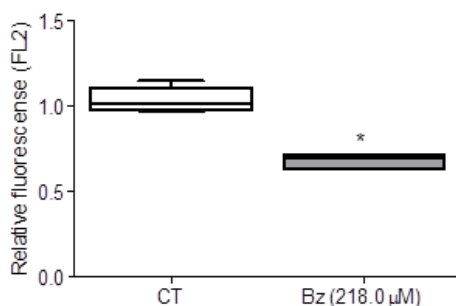
Figura 10 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com BZ (218 μ M) e marcadas com DCF durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

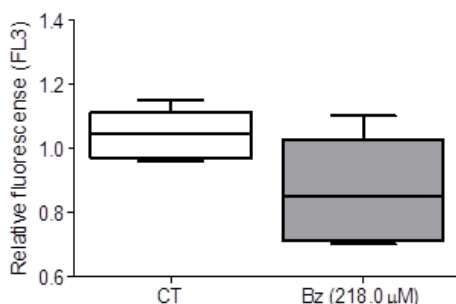
Figura 11 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com BZ (218 μ M) e marcadas com Rho123 durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com BZ (218 μ M) e marcadas com Laranja de acridina durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados demonstraram marcação predominante com 7-AAD (65,6%) (fig.9), aumento de cerca de 70% na geração de EROS (fig.10) e diminuição aproximada de 30% no potencial transmembrâncial mitocondrial (fig. 11). Os dados são semelhantes aos encontrados para Ctn (expostos adiante) e demonstram que o BZ também parece induzir morte por necrose em *T. cruzi*. A via de indução de morte por

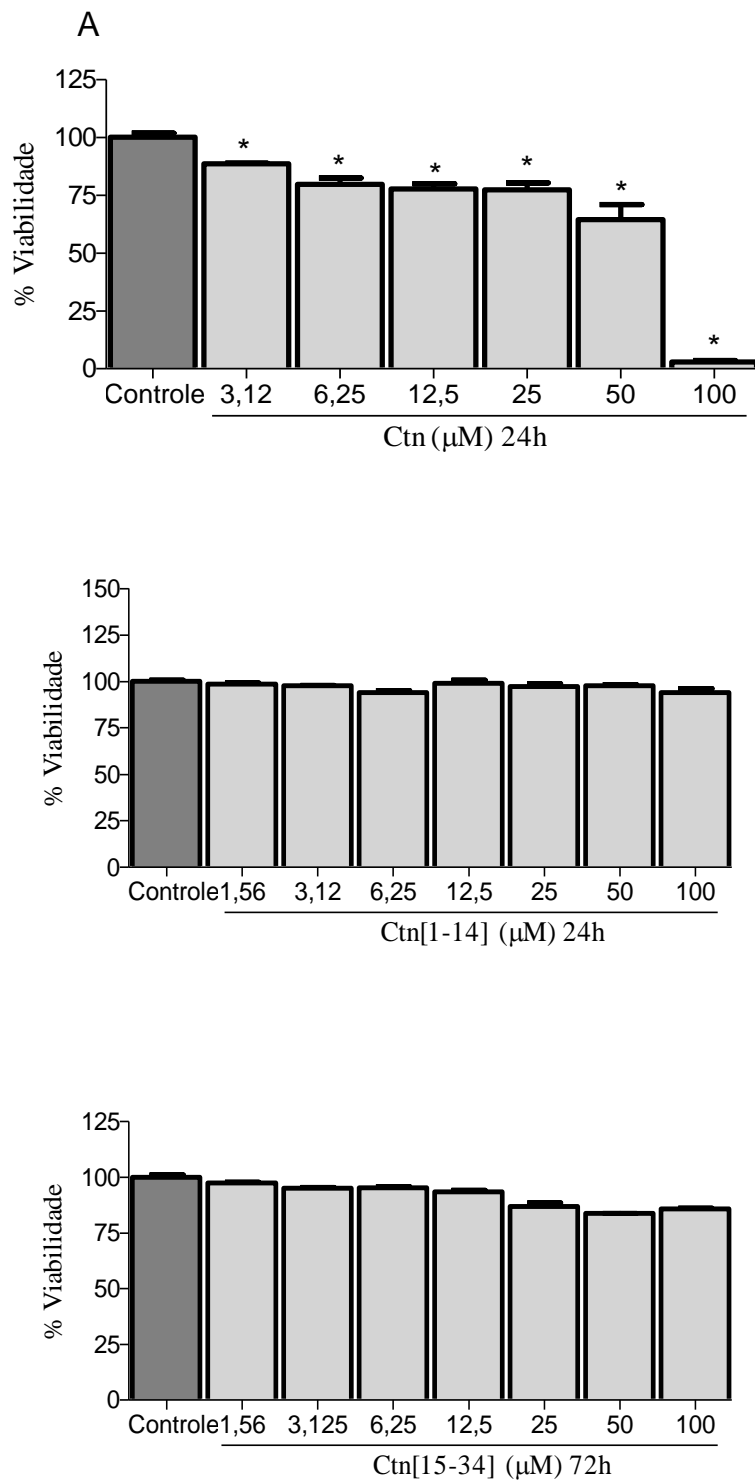
autofagia induzida por BZ foi descartada, uma vez que não houve diferença significativa entre população de epimastigotas marcados com laranja de acridina (fig. 12).

5.2 Estudo *in vitro* do efeito antichagásico dos PAMs

5.2.1. Atividade citotóxica de Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] *in vitro* sobre células LLC-MK₂

Objetivando investigar o efeito citotóxico da crotalicidina e seus fragmentos menores sobre células hospedeiras; as células LLC-MK₂ foram tratadas com os diferentes peptídeos, incubadas por 24 h e sua viabilidade foi determinada pela leitura espectrofotométrica do ensaio de MTT. Como Ctn[1-14] e Ctn[15-34] não demonstraram atividade citotóxica nas concentrações testadas, a EC₅₀ não pôde ser calculada, enquanto Ctn obteve uma EC₅₀ de 4,47µM (figura 13). Os fragmentos demonstraram menor toxicidade do que o peptídeo precursor, porém todos eles ainda foram menos tóxicos que o BZ que obteve EC₅₀ de 614,8 µM (tabela 2).

Figura 13 – Efeito citotóxico de Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] sobre a linhagem celular LLC-MK₂ após 24 h de tratamento, comparados ao grupo controle não tratado.



Fonte: Elaborada pelo autor

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

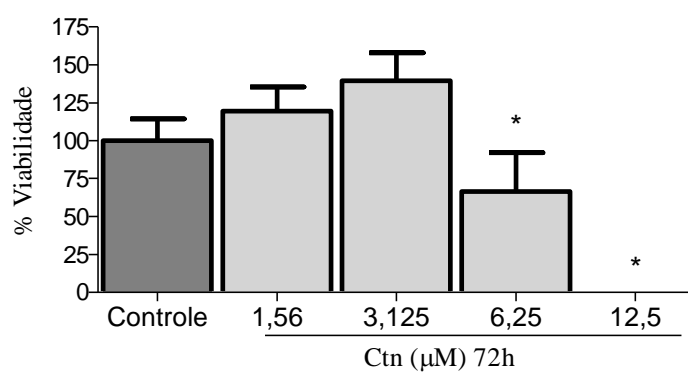
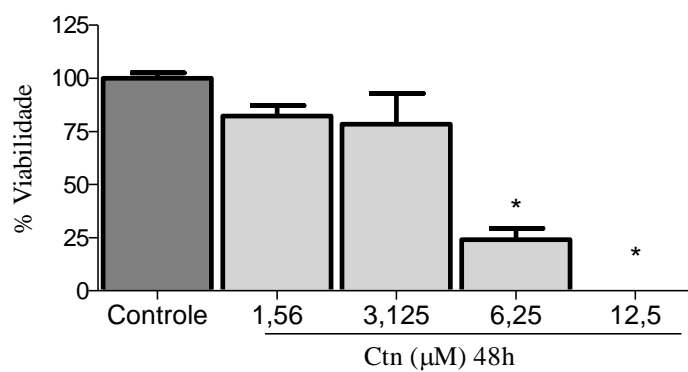
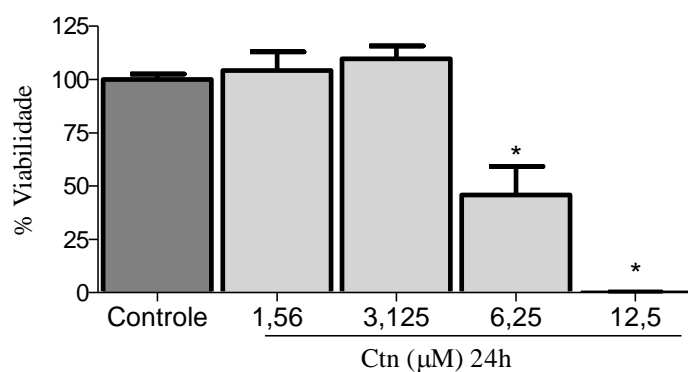
5.2.2 Atividade tripanocida in vitro de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 em formas epimastigotas de T. cruzi

Os ensaios de viabilidade celular dos PAMs sobre as formas epimastigotas foram realizados nos tempos de 24h, 48h e 72h a fim de avaliar a eficácia tripanocida dos peptídeos frente à droga de escolha para tratamento de DC, o BZ (tabela 2).

A crotalicidina mostrou efeito superior ao BZ nos três tempos de tratamento testados (figura 14). Após 24h de tratamento, Ctn obteve EC_{50} de $4,47\mu\text{M}$ enquanto o BZ apresenta uma EC_{50} de $218\mu\text{M}$ (tabela 2). No tempo de 48h também houve melhor atividade tripanocida do peptídeo em estudo com EC_{50} de $4,37\mu\text{M}$ em relação ao mesmo período de tratamento com o benzonidazol ($EC_{50} = 61,1\mu\text{M}$). Após 72h de exposição com as formas epimastigotas, o peptídeo foi capaz de inibir 50% do crescimento parasitário em uma concentração de $6,2\mu\text{M}$ enquanto o BZ necessita de uma concentração de $16,5\mu\text{M}$ para alcançar o mesmo efeito.

Ctn[1-14], Ctn[15-34] e o PAM humano LL-37 não demonstraram atividade em formas epimastigotas quando comparadas ao grupo controle não tratado nos três tempos de incubação e, portanto, nenhuma EC_{50} pôde ser calculada (figuras 15, 16 e 17).

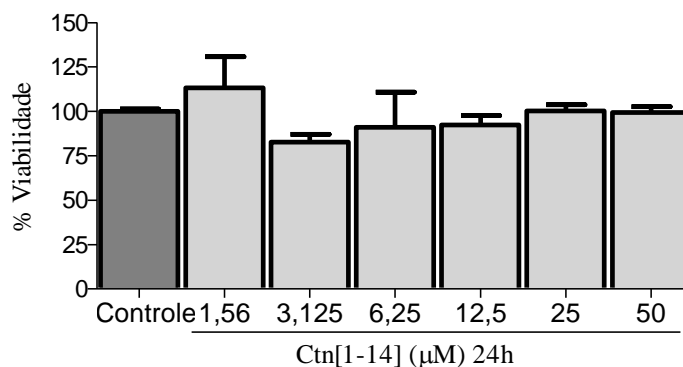
Figura 14 - Efeito citotóxico de Ctn sobre a forma epimastigota de *T.cruzi* após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.



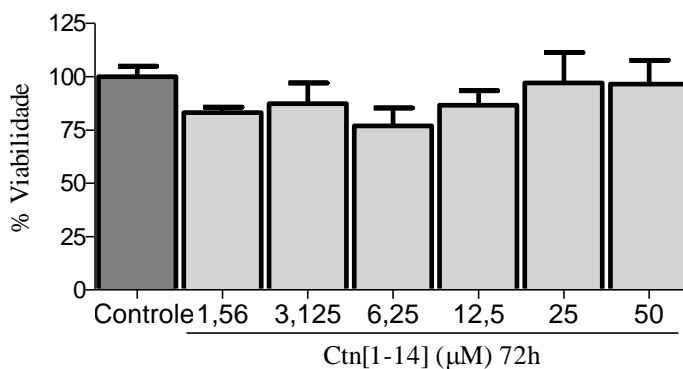
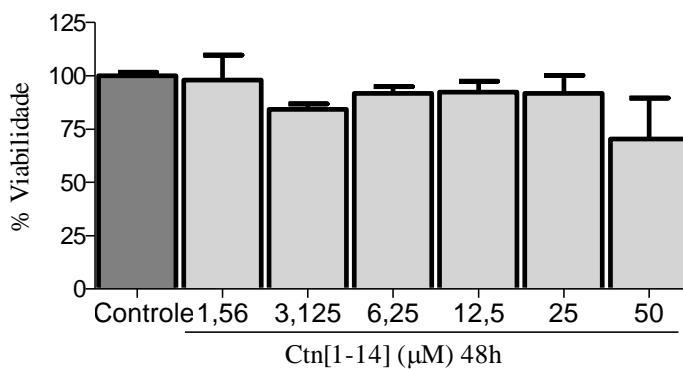
Fonte: Elaborada pelo autor

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

Figura 15 - Efeito citotóxico de Ctn[1-14] sobre a forma epimastigota de *T. cruzi* após 24h, 48 h e 72 h de



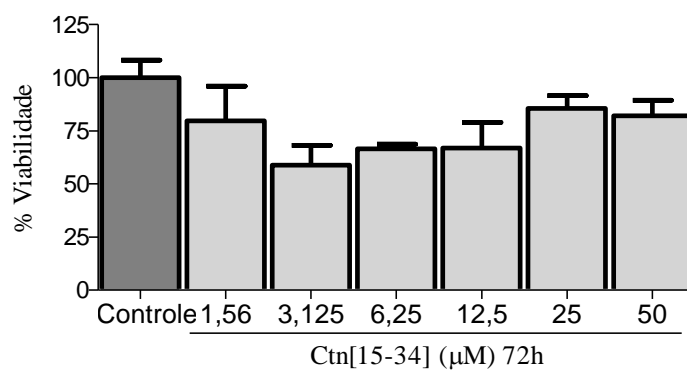
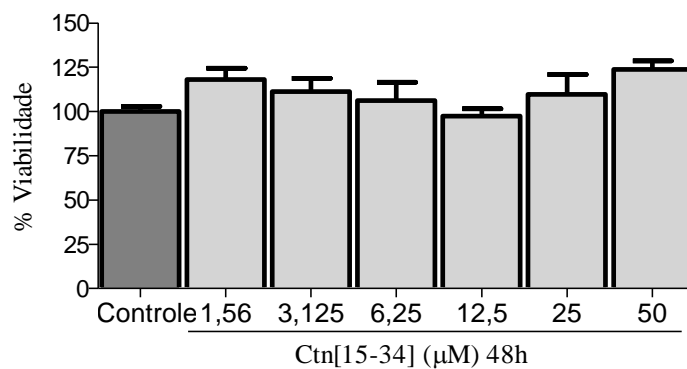
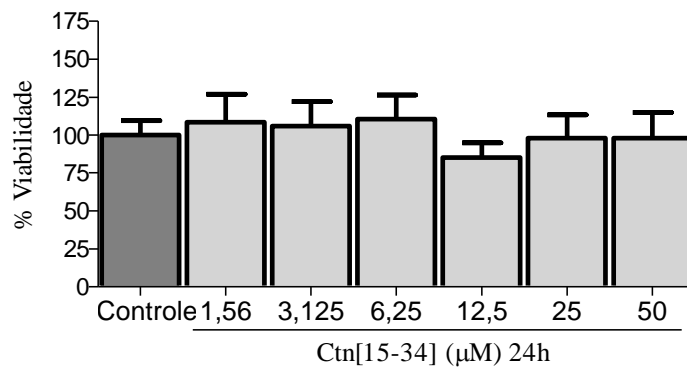
tratamento.



Legenda: O gráfico representa o percentual de inibição de crescimento dos parasitas, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com $*p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor

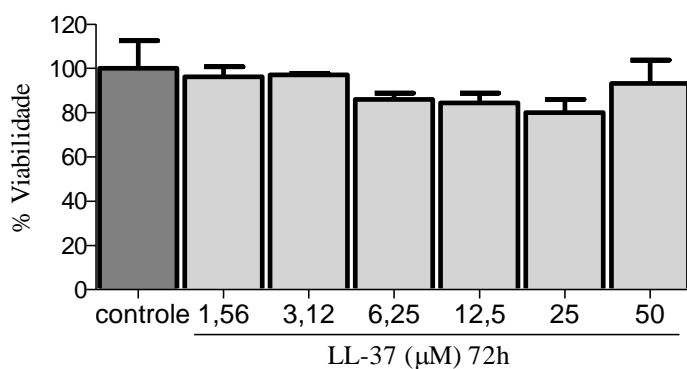
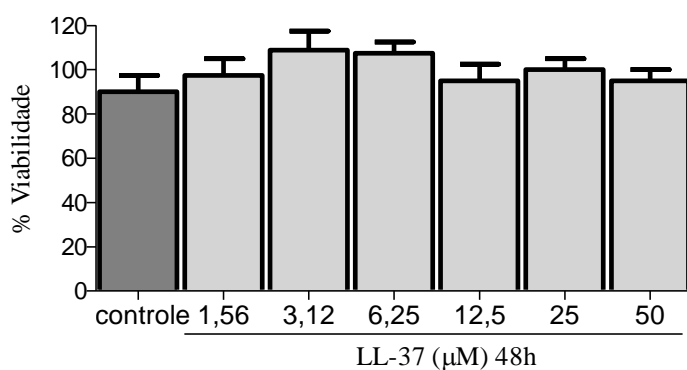
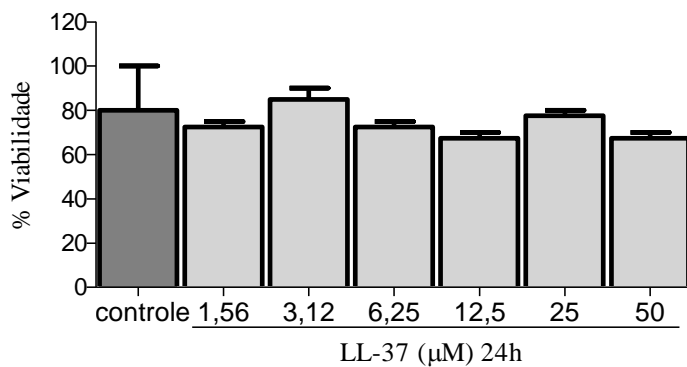
Figura 16 - Efeito citotóxico de Ctn[15-34] sobre a forma epimastigota de *T.cruzi* após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: O gráfico representa o percentual de inibição de crescimento dos parasitas, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com $*p < 0,05$.

Figura 17 - Efeito citotóxico de LL-37 sobre a forma epimastigota de *T. cruzi* após 24h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: O gráfico representa o percentual de inibição de crescimento dos parasitas, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com $*p < 0,05$.

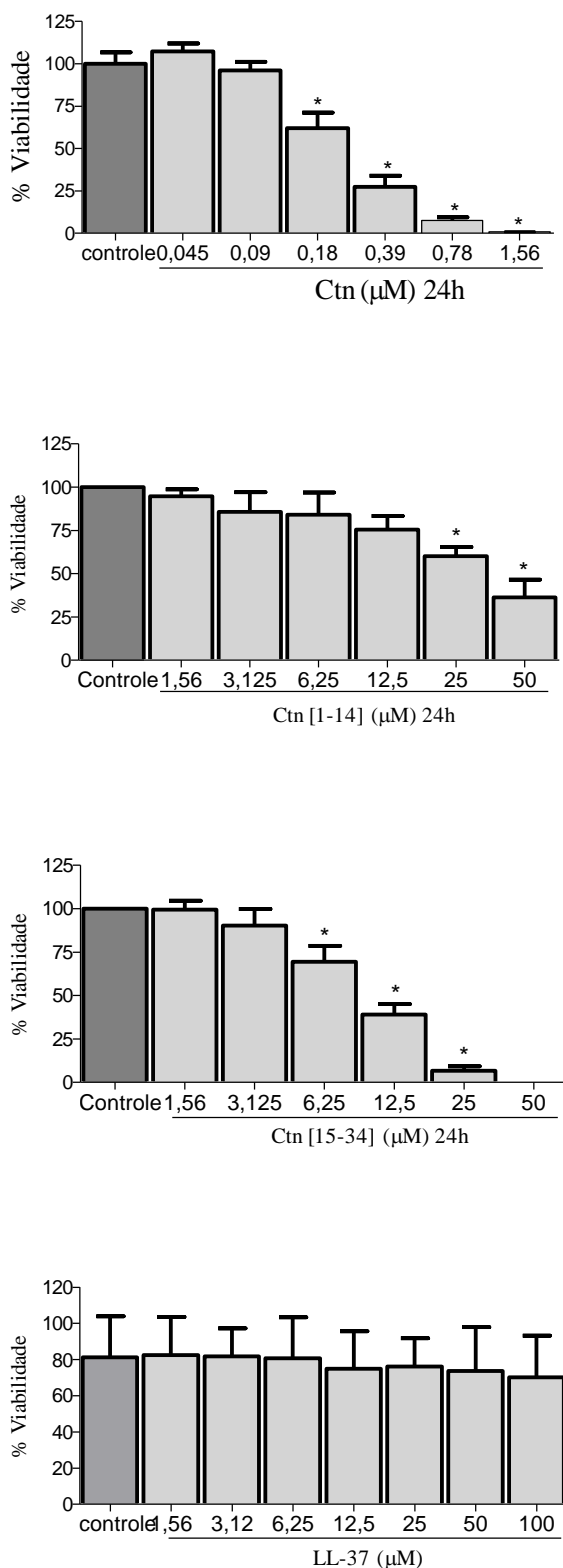
5.2.3 Atividade tripanocida in vitro de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 em formas tripomastigotas de T. cruzi

As formas tripomastigotas, obtidas a partir da eclosão de células LLC-MK2, foram incubadas com diferentes concentrações de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 durante 24h. Uma vez que essa forma parasitária não se multiplica, ensaios em tempos superiores seriam desnecessários.

De acordo com a figura 18, podemos observar que Ctn é tóxico para os parasitos a partir das concentrações 0,09 μ M e se aproxima de 100% de letalidade na concentração de 1,56 μ M, conferindo assim uma EC₅₀ de 0,22 μ M. Para Ctn[1-14] obtivemos uma EC₅₀ de 33,1 μ M, enquanto Ctn[15-34] apresentou EC₅₀ de 9,5 μ M. LL-37 não demonstrou efeito tripanocida em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

O benzonidazol atingiu a EC₅₀ de 282 μ M para a mesma forma parasitária (tabela 2).

Figura 18- Efeito citotóxico de Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37 sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* após 24h de tratamento.



Legenda: Os gráficos representam o percentual de inibição de crescimento dos parasitas, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com $*p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.4 Atividade tripanocida *in vitro* de Ctn em formas amastigotas de *T. cruzi*

Uma vez que apenas Ctn demonstrou efeito tripanocida contra as duas formas anteriores de *T. cruzi*, os ensaios com os demais peptídeos antimicrobianos (Ctn[1-14], Ctn[15-34] e LL-37) foram descontinuados.

Prosseguindo com a investigação do efeito tripanocida de Ctn, o ensaio a seguir foi realizado baseado nos resultados obtidos que demonstraram baixa toxicidade do peptídeo em células hospedeiras humanas (LLC) e uma EC_{50} nas formas tripomastigotas infectantes bastante reduzida.

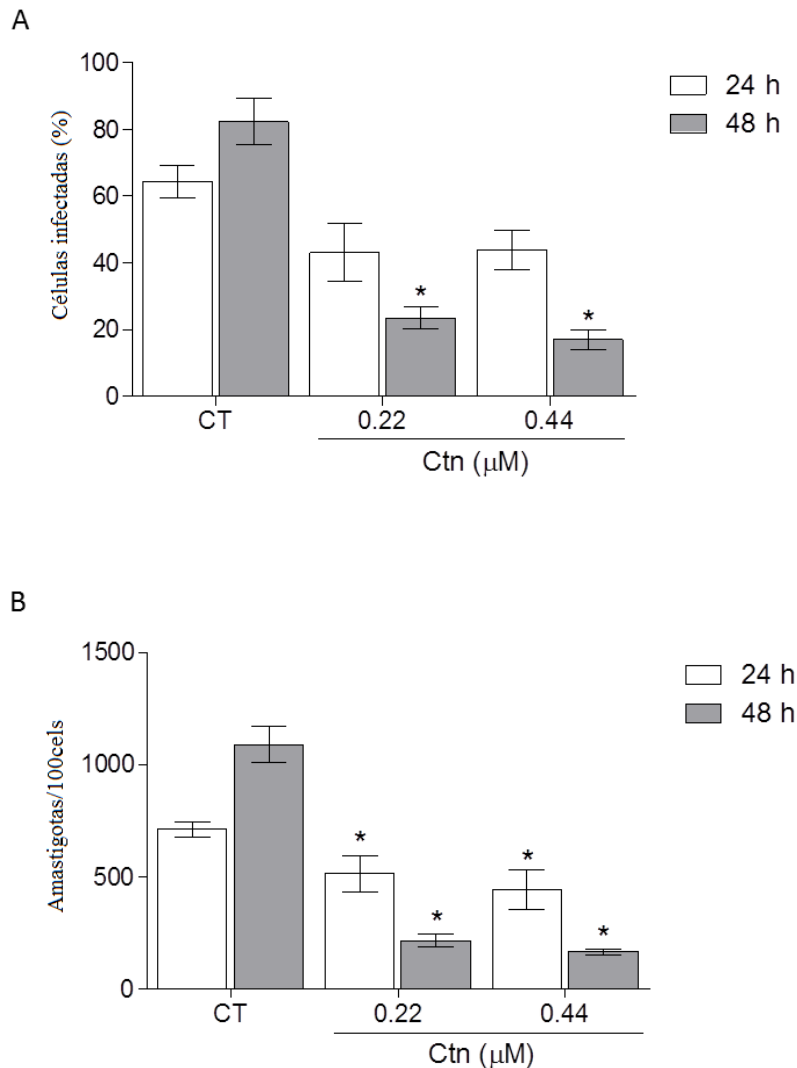
O efeito da crotalicidina sobre a forma intracelular do *Trypanosoma cruzi*, foi realizado com lâminas onde células LLC-MK2 continham as formas amastigotas intracelulares e foram tratadas durante 24 e 48h com o PAM. As concentrações para tratamento - 0,22 μ M (EC_{50}) e 0,44 μ M ($2xEC_{50}$) - foram selecionadas a partir dos ensaios de toxicidade em tripomastigotas, uma vez que para esse índice de EC_{50} também não houve toxicidade nas células hospedeiras LLC-MK₂. Após 24 e 48 horas de tratamento com Ctn, as lâminas foram analisadas para contagem do número de células infectadas e contagem de amastigotas no interior de cada célula.

A figura 19A demonstra que após 24h de tratamento com o peptídeo nas duas concentrações testadas (0,22 μ M e 0,44 μ M), observa-se uma diminuição da quantidade de células infectadas pelo parasito embora esse valor não seja estatisticamente significativo. Porém, após 48 de incubação em ambas as concentrações testadas Ctn reduziu significativamente o número de células infectadas, o que sugere um mecanismo de morte lento.

Para os valores dos percentuais de amastigotas nas células, foi observada uma diminuição significativa em ambas as concentrações testadas e ambos os tempos de incubação com o peptídeo (figura 19B). Os resultados demonstram que o efeito de Ctn em formas amastigotas parece não ser dose-dependente.

O Bz, por sua vez, reduziu a quantidade de células infectadas e o número de amastigotas por célula nas concentrações de 282 e 564 μ M (tabela 2).

Figura 19 - Efeito da crotalicidina sobre células LLC-MK2 infectadas com a forma amastigota intracelular de *T. cruzi*.



Legenda: Percentual de células infectadas em 24 h e 48 h de incubação (A) e amastigotas/100 células em 24 e 48 h de incubação (B).

O gráfico representa o percentual de inibição de crescimento dos parasitas, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes ($n=3$) incubados com crotalicidina nas concentrações IC ($0,22\mu\text{M}$) e $2\times\text{IC}$ ($0,44\mu\text{M}$) das formas epimastigotas. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com $*p<0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.5 Determinação do mecanismo de morte celular induzido por Ctn em *T. cruzi*

5.2.5.1 Potencial necrótico e/ou apoptótico

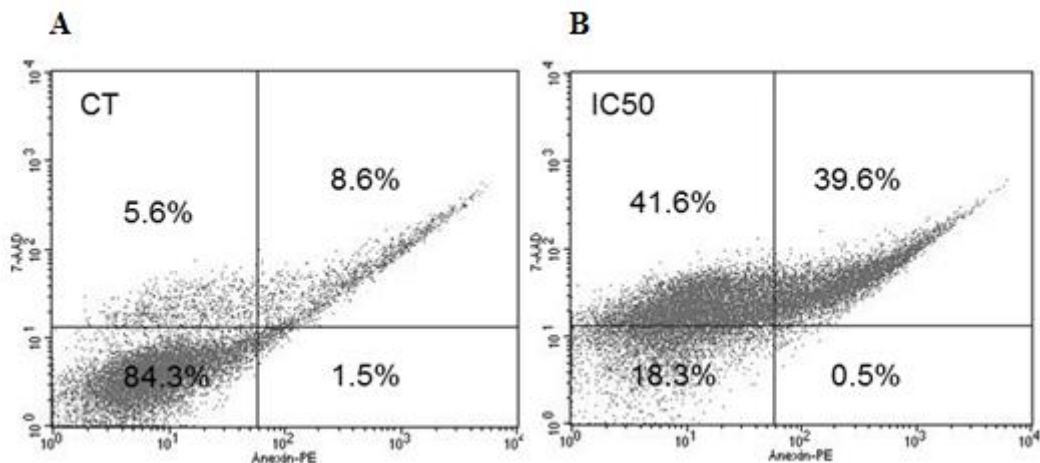
A fim de elucidar o mecanismo de morte celular induzido pelo Ctn (peptídeo que apresentou os melhores resultados), formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com EC50₅₀ da droga na forma parasitária (4,47 μ M) e posteriormente marcadas com Anexina e 7-AAD. Neste ensaio, observamos a marcação predominante de células com 7-AAD (figura 20).

A figura 20 apresenta os dados em forma de histogramas biparamétricos com dois eixos, onde no quadrante inferior esquerdo encontra-se a população de células não marcadas, no superior esquerdo células marcadas com 7-AAD, no superior direito a população é duplamente marcada com os 7-AAD e Anexina, enquanto no canto inferior direito o marcador prevalente das células é a Anexina.

A figura 20A é referente ao grupo controle não tratado. Nele, observa-se redução do percentual de células viáveis e aumento do percentual de células marcadas com 7-AAD. A população de células predominante encontra-se no quadrante inferior direito onde não há marcação e, portanto, as células são viáveis. Já para a figura 20B correspondente ao grupo de epimastigotas tratados com Ctn, há uma maior predominância de células marcadas com 7-AAD (quadrante superior esquerdo) -41,6% - evidenciando uma possível morte por necrose. Como já foi evidenciado nos ensaios com amastigotas, o mecanismo de morte induzido por Ctn parece ser lento, o que confere também uma população duplamente marcada 7-AAD/AX (indicativo de necrose e/ou apoptose tardia) – 39% presente no quadrante superior direito sugestivo de apoptose tardia.

A figura 21 evidencia os resultados citados acima de forma numérica. Observamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a população de células tratadas com crotalidina marcadas pelo 7-AAD quando comparada às outras marcações e ao grupo controle.

Figura 20 - Citometria de fluxo de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com crotalicidina (4,47 μ M) e marcadas com Anexina e 7-AAD. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

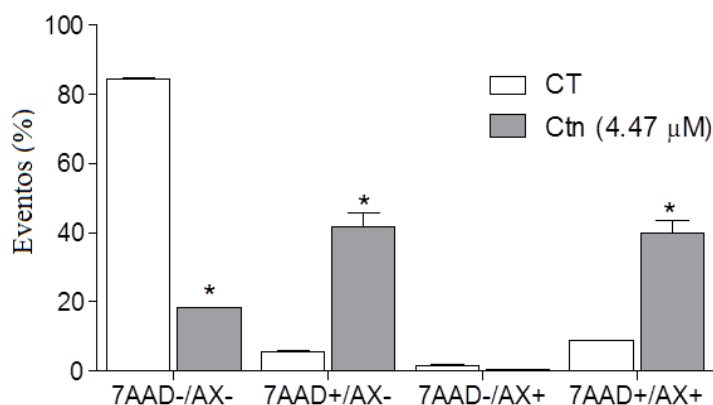


Legenda: Os valores percentuais são médias de 10.000 eventos de três experimentos independentes.

CT – Controle não tratado

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Potencial necrótico de Crotalicidina em formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Anexina e 7-AAD através de Citometria de fluxo.



Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular induzida na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com crotalicidina. Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método 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;

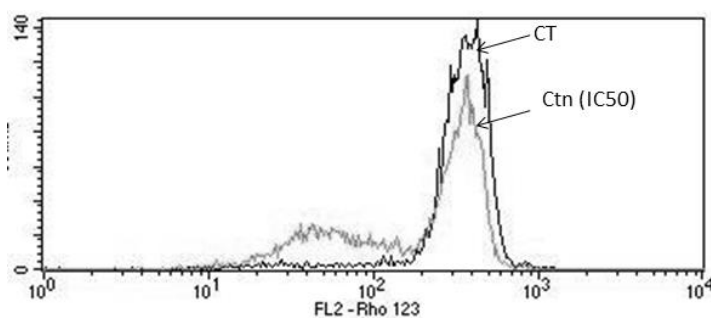
7AAD+/AX+ : marcado com 7-AAD e Anexina V-PE).

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.5.2 Potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

No ensaio de marcação com a Rodamina (Rho 123) foi elucidado a alteração do potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas tratadas com Ctn. O histograma mostra uma diminuição da população de células tratadas com Ctn quando comparadas ao grupo controle não tratado evidenciando diminuição de fluorescência (figura 22). A redução da intensidade relativa de fluorescência demonstrada na figura 23 também indica que há sim um dano mitocondrial, 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.

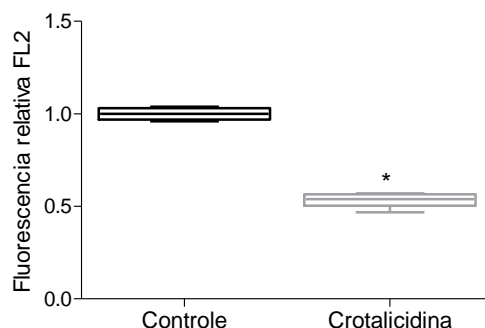
Figura 22 - Histograma representativo do sinal fluorescente de rodamina 123 de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com crotalicidina (4,47 μM) durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 23 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com crotalidina (4,47 μ M) e marcadas com Rho123 durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



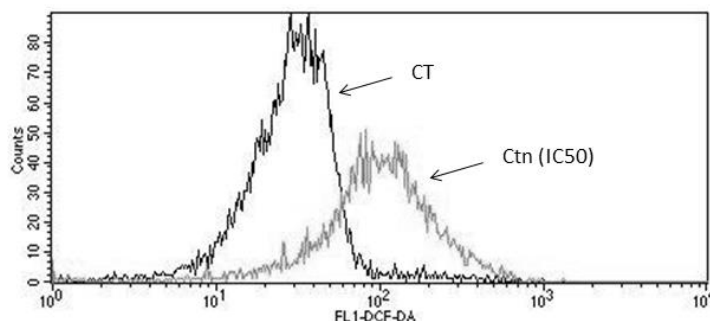
Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.5.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

No ensaio em que as formas epimastogotas de *T. cruzi* tratadas com Ctn foram incubadas com DCF foi observado aumento de EROs citoplasmático. O histograma mostra um desvio à direita da população de células tratadas com Ctn (figura30). Além disso, a figura 31, também evidencia um aumento significativo ($p < 0,05$) de células marcadas pelo DCF quando essa população é comparada ao grupo controle não tratado.

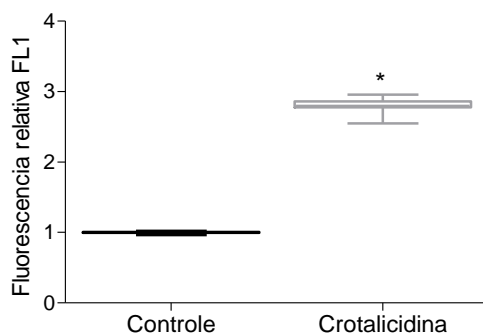
Figura 30 - Histograma representativo do sinal fluorescente de DCFH-DA de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com crotalidina (4,47 μ M) durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com crotalidina (4,47 μ M) e marcadas com DCF durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



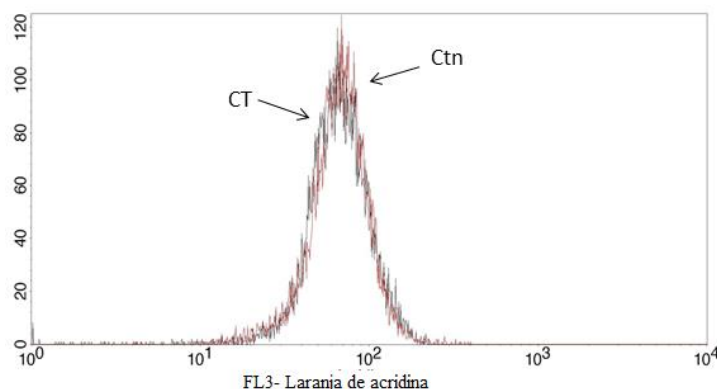
Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.5.4 Avaliação de indução de autofagia

Para finalizar a identificação do mecanismo de morte celular, foi realizado ensaio com laranja de acridina. O processo de autofagia celular induz a formação de fagossomos com características ácidas onde o marcador se deposita. Os resultados não evidenciam processo autofágico induzido por Ctn, uma vez que não há diferença significativa entre a fluorescência emitida pelo grupo tratado com Ctn e o grupo controle não tratado (figuras 32 e 33).

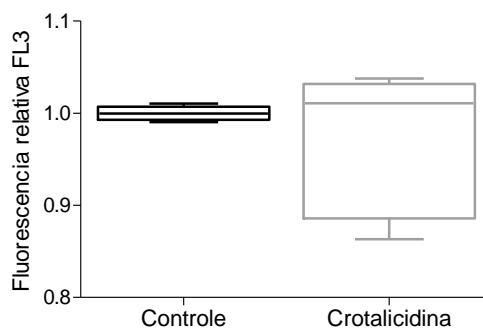
Figura 32 - Fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com laranja de acridina e tratados com crotalidina ($4,7\mu\text{M}$) durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 33 - Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com crotalidina ($4,47\mu\text{M}$) e marcadas com Laranja de acridina durante 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.



Legenda: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet ($*p < 0,05$ vs. grupo controle).

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.5.5 Alterações morfológicas induzidas por Crotalidina em formas epimastigotas de *T. cruzi*

As análises por microscopia eletrônica de varredura em formas epimastigotas tratadas com crotalidina ($4,47\mu\text{M}$) durante 24h e comparadas com células não tratadas evidenciaram danos morfológicos provocados pelo peptídeo ao parasito. A figura 34 mostra que o grupo controle não tratado apresenta parasitos intactos com membranas bem preservadas. Enquanto o grupo tratado com Ctn (figura 35) apresenta alterações visíveis de degradação completa da cauda (fig. 35A), modificação importante da forma (fig.35B) e extravasamento de conteúdo celular (fig. 35C).

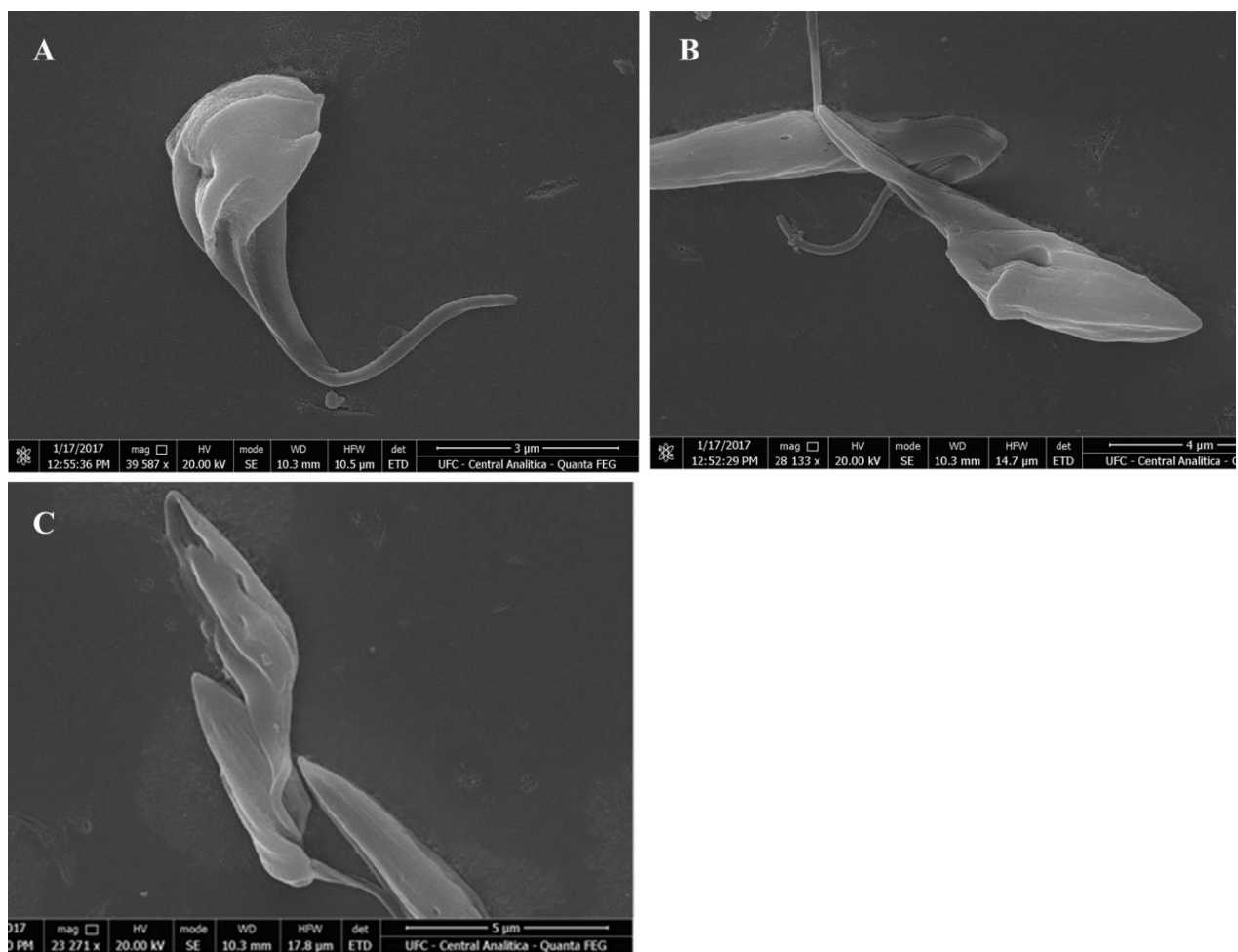
Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de *T. cruzi* não tratadas após 12h de incubação.



Legenda: Observa-se parasito com comprimento adequado, corpo alongado típico e intacto morfológicamente.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 35 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de *T.cruzi* tratadas com crotalicidina (4,47 μ M).



Legenda: Os parasitos tratados durante 12 h com Ctn na EC_{50} apresentaram encolhimento celular (A) e perda de integridade da membrana com presença de poros (B-C).

Fonte: Elaborada pelo autor

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A tripanossomíase americana, também conhecida por doença de Chagas (DC), é uma infecção sistêmica crônica e negligenciada que representa um dos principais problemas de saúde pública na América Latina e afeta aproximadamente 37% dos indivíduos mais pobres do mundo, além de acarretar elevada carga de morbimortalidade nas regiões onde são endêmicas, incluindo o Brasil (WHO, 2016). A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 70.000.000 de pessoas no mundo vivem sob risco de contrair a DC e cerca de 7.000 vão à óbito decorrentes de complicações da doença anualmente (CHATELAIN, 2017; DIAS et al., 2016;).

O tratamento atualmente disponível no Brasil para tratamento da DC, realizado com Benzonidazol, apresenta eficácia limitada com um índice de cura de apenas 20% na fase crônica da doença (URBINA; DOCAMPO, 2003; SOARES et al., 2011). O desenvolvimento de condições clínicas debilitantes como arritmias cardíacas, megaesôfago e megacólon em aproximadamente 30% das pessoas infectadas torna a DC incapacitante (WHO, 2016). Tais razões justificam então a necessidade da busca por novos alvos terapêuticos para a DC.

Produtos de origens naturais, tais como venenos de animais ou seus derivados, possuem moléculas bioativas que podem servir de modelo para o desenho de novas drogas (GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005; ALTMANN, 2011; MENEZES et al., 2012).

Nesse contexto, componentes de venenos têm estimulado muitas pesquisas na busca de descoberta de drogas, com alguns sucessos notáveis como o captopril, desenvolvido a partir do veneno de *Bothrops jararaca*; o exenatide, peptídeo proveniente da saliva do *Heloderma suspectum* (monstro de gila) com potente atividade hipoglicemiante e a hirudina, proveniente da sanguessuga *Hirudo medicinalis* que é capaz de antagonizar a trombina e funciona como potente anticoagulante sanguíneo (HARVEY, et al., 2014).

Dentre esses derivados bioativos que despertam interesse comercial, também estão os peptídeos antimicrobianos (PAM) (BANDURSKA et al., 2015). Propriedades imunomoduladoras, antimicrobianas e antiparasitárias relacionadas a esses peptídeos já

foram descritas (BARKSDALE; HRIFKO; VAN HOEK, 2017; CAUCHARD et al., 2016; FALCÃO et al., 2015; MCGWIRE et al., 2010).

PAMs apresentam inúmeras vantagens no que diz respeito à aplicação terapêutica, incluindo amplo espectro antimicrobiano, início de ação rápido e baixa possibilidade de resistência por parte dos micro-organismos (SEO et al., 2012). Relatos na literatura apontam uma variedade de ações de PAM além da antibacteriana, como combate à células tumorais (CRACK et al., 2012), ações contra vírus (UPLERTLOP et al., 2011), fungos (CAVALCANTE et al., 2016) e protozoários (LIMA et al., 2016; MELLO et al., 2017). Essas atividades biológicas não são excludentes entre si. Assim sendo, um PAM pode desempenhar mais de uma ação biológica aumentando ainda mais a viabilidade terapêutica desses peptídeos (GUO et al., 2013).

Dentre os PAMs de importância clínica, está o grupo das catelicidinas que foram identificadas inicialmente em 1995 e encontram-se presentes em plantas, animais e em células humanas (queratinócitos, leucócitos e mastócitos) na forma inativa da proteína hCAP-18 que após clivada origina a catelicidina LL-37 (MARCINKIEWICZ, MAJEWSKI; 2016). A síntese desses peptídeos acontece nos ribossomos e pode ser constitutiva ou induzida a partir de algum estímulo inflamatório ou lesão (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

LL-37, assim como os outros PAMs pertencentes à mesma classe – as catelicidinas - apresenta conformação α -helicoidal com um domínio N-terminal e já demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Porém, estudos discutem que, na presença de soro humano, o efeito antibacteriano e a atividade citotóxica do LL-37 são inibidos (JOHANSSON et al., 1998).

Catelicidinas presentes na glândula de *Crotalus durissus terrificus*, Ctn e seus fragmentos apresentaram uma importante ação antimicrobiana contra cepas de diversas bactérias tanto gram positivas (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*), quanto em gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*) quando comparados à substâncias antimicrobianas disponíveis no mercado como a Gentamicina (FALCÃO et al., 2014).

A relevância desse PAM vipericídeo como possível agente anti-infeccioso motivou o presente estudo na busca por uma potencial atividade tripanocida da

crotalicidina [Ctn] e seus fragmentos (Ctn [1-14] e Ctn [15-34]). Os peptídeos foram comparados com a droga de escolha para tratamento da DC - o benzonidazol - a fim de avaliar a viabilidade terapêutica. Tendo em vista a semelhança estrutural entre Ctn e o PAM-humano LL-37 (FALCÃO et al. 2014), a catelicidina humana também foi testada nas mesmas concentrações das catelicidinas vipericídeas a fim de demonstrar se a possível atividade anti *T. cruzi* seria própria da família das catelicidinas.

Para realização dos testes *in vitro*, foi selecionada a cepa Y de *T. cruzi*, que apresenta resistência ao benzonidazol e permite a melhor investigação de substâncias tripanocida bioativas (CHERKESOVA et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que Ctn apresentou uma alta efetividade em todas as formas do *T. cruzi*: epimastigotas (fase proliferativa no inseto), tripomastigota (forma infectante não proliferativa) e amastigota (forma intracelular humana), quando comparada à droga de escolha para o tratamento da doença disponível no mercado – o Benzonidazol.

Em formas epimastigotas, o PAM isolado de *Crotalus* mostrou-se muito mais eficaz em todos os tempos de tratamento (24, 48 e 72h) quando comparados ao BZ, evidenciando que uma menor concentração do peptídeo é necessária para atingir os valores de EC₅₀. No tempo de 24h de tratamento as concentrações de EC₅₀ do Benzonidazol (218µM) foram 48 vezes maiores do que as do peptídeo testado (4,47µM). Para os tempos de 48h e 72h as EC₅₀ do BZ foram 13 e 2 vezes maiores do que as da crotalicidina respectivamente. A eficácia de Ctn nessa forma parasitária, porém, não parece ser tempo-dependente, uma vez que a EC₅₀ permanece praticamente constante durante as 72h de incubação (aproximadamente 4,4µM).

Na forma infectante do parasito, observa-se uma efetividade ainda maior da crotalicidina em relação ao BZ, com redução de mais de 1000 vezes nas doses empregadas das duas substâncias testadas para atingir a EC₅₀ nas formas tripomastigotas. Ctn apresenta EC₅₀ de 0,22µM, frente a uma EC₅₀ de 282µM do BZ.

Além dos bons resultados antiparasitários *in vitro* da crotalicidina, o presente estudo observou uma baixa toxicidade em células LLC-MK2 atribuída ao peptídeo, o que torna Ctn uma ferramenta terapêutica antiparasitária promissora (NWAKA; HUDSON, 2006).

De acordo Nwaka e Hudson (2006), para que novas drogas antiparasitárias sejam desenvolvidas, critérios como baixo potencial citotóxico e seletividade parasitária devem ser avaliados. Segundo os autores, novas substâncias com atividade anti *T. cruzi* devem apresentar $EC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ para a forma tripomastigota e índice de seletividade (IS) > 50 . O IS é descrito como a razão entre a concentração celular tóxica e a EC_{50} da forma infectante. Nesse contexto, Ctn atende aos preceitos, uma vez que apresenta EC_{50} de $0,913 \mu\text{g/mL}$ e IS de 203,2. Usando o BZ como parâmetro comparativo, a droga para tratamento de DC apresenta um IS de 2,18 apenas.

O efeito tripanocida, assim como as limitações terapêuticas do Bz, já são de conhecimento científico e outros autores também realizaram ensaios utilizando o fármaco como parâmetro comparativo para seus resultados. Silva et al. (2011) obtiveram uma EC_{50} nas formas tripomastigotas de $12,9 \mu\text{M}$ e IS de 77,5. Os autores não utilizaram a cepa Y de *T. cruzi* resistente ao BZ e, por isso, encontraram melhores resultados do que os do presente trabalho. Ensaio na forma amastigota realizados por TIMM et al. (2014) demonstraram atividade do fármaco somente após 96h em uma concentração de $82 \mu\text{M}$.

Desta forma, a fim de concluir nosso estudo da atividade da crotalidina frente às diferentes formas do ciclo evolutivo do *T. cruzi*, foram realizados os ensaios em formas amastigotas. Ctn também foi capaz de reduzir o número de células infectadas e a quantidade de formas amastigotas intracelular em concentrações de $0,22 \mu\text{M}$ e $0,44 \mu\text{M}$ (que correspondem à EC_{50} e $2 \times EC_{50}$ nas formas tripomastigotas) após 24h e 48h de incubação. Resultados semelhantes utilizando o BZ só foram alcançados utilizando as concentrações de $280 \mu\text{M}$ e $560 \mu\text{M}$ com redução de apenas 25% do percentual de células infectadas e diminuição de 46% do número de amastigotas celulares após 24h de tratamento.

A resistência das formas amastigotas intracelulares ao tratamento tem sido reportada em outros estudos como um resultado da dificuldade de certas drogas atravessarem a membrana da célula infectada e obter o acesso ao parasita dentro do vacúolo parasitóforo (BORGES et al., 2012). O principal exemplo dessa limitação é o próprio Benzonidazol que têm permeação pobre através da membrana plasmática, sendo necessário um enorme gradiente de concentração para obter acesso aos amastigotas citoplasmáticos (MORILLA; ROMERO, 2015). Portanto, o desafio terapêutico na DC

baseia-se principalmente na identificação de substâncias que apresentem toxicidade seletiva para as formas amastigotas intracelulares, assim como Ctn demonstrou.

Estudos que investiguem ação tripanocida na DC a partir de veneno total ou de porções isoladas de *Crotalus durissus terrificus* ainda são inéditos. Porém, Passero et al., (2002) relataram atividade antileishmania de três venenos crotálicos (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*), onde a *Crotalus durissus terrificus* exibiu maior potencial antiparasitário nas formas promastigotas pesquisadas.

Trabalhos semelhantes envolvendo venenos totais e frações proteicas de outras espécies de serpentes já foram realizados. Gonçalves e colaboradores (2002) avaliaram o efeito tripanocida do veneno de *Bothrops jararaca* sobre a forma epimastigotas e obteve uma EC₅₀ de 0,1µM no tempo de 5 dias de tratamento.

Ensaio de investigação tripanocida envolvendo venenos de *Crotalus* já foram realizados por Adade e colaboradores (2011). O grupo testou o veneno da *Crotalus viridis viridis* nas três formas evolutivas de *T. cruzi* e para as amastigotas encontraram uma diminuição de 76% no número de parasitas por célula infectada e uma redução de 94% no número de parasitas por 100 células após 96 h de infecção.

Em estudo posterior, o mesmo grupo decidiu isolar e purificar a proteína “Crovirin” isolada do referido veneno. Os autores só testaram duas formas evolutivas de *T. cruzi* e os ensaios em formas tripomastigotas apresentaram uma EC₅₀ de 1,10µg/mL e um IS de 18,2. Enquanto para as formas amastigotas, os resultados só se mostram mais eficazes que o BZ após um tempo de 72h e uma concentração de 1,84µg/mL da proteína isolada da *Crotallus* (ADADE, 2014). Mesmo apresentando IS menor e concentrações utilizadas maiores que Ctn encontradas no presente trabalho, o grupo sugere que a crovirina pode ser útil no desenvolvimento de novos quimioterapêuticos tripanocida.

Falcão et al. (2015) realizaram a clivagem de Ctn em dois fragmentos com características estruturais distintas Ctn [1-14] e Ctn [15-34] e avaliaram os efeitos dos fragmentos comparados ao peptídeo original. Entre outros resultados, os pesquisadores relataram um potencial antimicrobiano, principalmente contra bactérias GRAM negativas; moderado efeito hemolítico (aproximadamente 33% na concentração máxima

testada - 400 μ M) e atividade antitumoral com valores de EC₅₀ menores de 1 μ M associadas à Ctn [15-34].

Em outro trabalho publicado recentemente, Ctn [15-34] também repetiu a atividade do peptídeo parental contra diversas cepas de *Candida*. Além disso, Ctn [15-34] ainda conseguiu melhores resultados de toxicidade celular (célula renal HK-2) e menor efeito hemolítico em eritrócitos humanos, tornando-se um alvo terapêutico promissor para infecções fúngicas (CAVALCANTE et al., 2016).

No presente estudo, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] também foram investigados quanto ao efeito antichagásico. Em formas epimastigotas, ambas as frações não demonstraram atividade frente ao parasita nos tempos de 24, 48 e 72h, quando comparados ao grupo não tratado. Na forma tripomastigota infectante do parasita, Ctn [1-14] obteve uma EC₅₀ de 33,1 μ M e Ctn [15-34] de 9,5 μ M.

Ainda utilizando os critérios de Nwaka e Hudson (2006) que estabelecem o IS para potenciais drogas contra *T. cruzi*, foi realizado ensaio de toxicidade em células LLC-MK2 de Ctn [1-14] e Ctn [15-34] e obtidos IS >3 e >10, respectivamente. Para ambos, a EC₅₀ foi superior a 2 μ g/mL e, portanto, os fragmentos de peptídeos não puderam ser considerados bem sucedidos quanto à atividade tripanocida fazendo com que os ensaios seguintes fossem descontinuados.

A catelicidina humana LL-37, por sua vez, tem comprovada atividade antimicrobianas contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*; antifúngica contra *Candida albicans*; e antiviral contra importantes cepas virais como HIV-1, influenza e herpes simplex. A LL-37 inibe a infecção viral bloqueando a entrada dos vírions nas células hospedeiras a partir da interação direta com proteínas do micro-organismo, graças a sua estrutura helicoidal (BANDURSKA et al., 2015; JOHANSSON et al., 1998).

O efeito citotóxico de LL-37 também já foi demonstrado utilizando três tipos diferentes de células eucarióticas: tripomastigotas de *T. cruzi*, linfócitos T associados à mucosa (MALT) e células PBL. Para estas células, a toxicidade observada variou entre 13-25 μ M (JOHANSSON et al., 1998).

No presente estudo, porém LL-37 não apresentou atividade contra formas epimastigotas e tripomastigotas da DC mesmo em concentrações mais elevadas (50 μ M e 100 μ M respectivamente) e por isso seu estudo foi descontinuado.

Com isso, evidencia-se que, apesar da semelhança estrutural entre os dois PAMs da família das catelicidinas, LL-37 não exerce ação tripanocida, diferente do PAM isolado da *Crotalus durissus terrificus* que se mostrou eficaz nas três formas parasitárias da doença de Chagas.

Outras catelicidinas de mamíferos já demonstraram atividade anti-protozoário em *Trypanosoma brucei* através da interrupção da integridade da membrana celular (MCGWIRE et al., 2003) e uma catelicidina equina (e-CATH1) foi eficaz contra *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma equiperdum* causando permeabilização da membrana plasmática e interrupção do potencial da membrana mitocondrial (CAUCHARD et al., 2016).

Evidencia-se, no presente estudo, que as formas tripomastigotas e amastigotas parecem ser mais suscetíveis à Ctn do que as epimastigotas. Esta susceptibilidade aumentada pode estar relacionada à prevalência de moléculas carregadas negativamente na membrana celular do parasito especialmente nessas formas evolutivas, como glicoproteínas de mucina e ácido siálico que estão implicadas nas interações hospedeiro-parasito e PAM-parasito (DE SOUZA et al., 2010). Isso também explica o fato de Ctn [1-14] e Ctn [15-34] que possuem cargas +9 e +8, respectivamente, apresentarem ação mais discreta em tripomastigotas quando comparadas a Ctn (carga +16) devido menor interação com essas moléculas aniônicas e não apresentarem toxicidade em formas epimastigotas.

Diante desses resultados e com o intuito de elucidar o mecanismo de morte induzido por Ctn (peptídeo mais promissor) em *T. cruzi*, ensaios de citometria de fluxo utilizando marcadores específicos e microscopia eletrônica de varredura foram realizados.

A similaridade do cinetoplasto entre as formas amastigotas e epimastigotas e a facilidade de manutenção em culturas tornaram a forma epimastigotas mais viável para o estudo da via de morte celular (GIRARD et al., 2016; SOUZA, 2002).

Inicialmente em teste de citometria de fluxo os parasitos foram marcados com 7-AAD e anexina-FITC (AX) e tratadas com Ctn não foi possível estabelecer a via de morte de *T.cruzi*, devido um percentual semelhante de células marcadas com 7-AAD (indicativo de necrose) – 41,6% – e uma população duplamente marcada 7-AAD/AX (indicativo de necrose e/ou apoptose tardia) – 39%. Os resultados evidenciaram, porém, que a lise da membrana celular é um aspecto importante do efeito do peptídeo.

A partir desse resultado, dois outros ensaios foram realizados para avaliar a geração de EROS e uma possível modificação no potencial transmembrana mitocondrial. Os resultados subsequentes mostraram geração de espécies reativas de oxigênio e a perda de potencial transmembrana mitocondrial. Segundo Menna-Barreto e colaboradores (2009) tais achados confirmam a via de morte necrótica com a degradação da membrana celular de *T.cruzi*.

A análise de Rho123 mostrou que ocorreu redução na fluorescência no grupo de parasitos tratados com a crotalidina, 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 ATP, culminando na necrose da célula (KUMAR et al., 2015).

O aumento de EROS pôde ser comprovado através da análise de fluorescência, utilizando a coloração com DCFH-DA. Apesar do seu efeito citotóxico bem conhecido, o papel de EROs nestes protozoários é complexo, porém alterações mitocondriais parecem estar intimamente ligadas à produção desses radicais. Dependendo da concentração, estas espécies reativas poderiam causar morte dos parasitos devido 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 mitocondrial são produzidos na mitocôndria de *T. cruzi* (PIACENZA et al., 2009).

A morte celular por necrose é geralmente caracterizada por lise de membrana e aumento de volume citoplasmático (BERGHE et al., 2013). O rompimento da membrana celular forma os poros que permitiram a entrada de corantes que não conseguiriam atravessar membranas intactas, como 7-AAD que se ligou ao DNA do parasito (ZEMBRUSKI et al., 2012).

O processo autofágico também foi investigado como via alternativa de indução de morte através da marcação com laranja de acridina. Não houve, no entanto, aumento significativo de fluorescência entre as células tratadas com Ctn e o controle negativo, indicando que não houve aumento do acúmulo do marcador em compartimentos ácidos que indicariam autofagia.

O presente estudo encontrou dados semelhantes aos de outros grupos que caracterizaram a atividade tripanocida contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e obtiveram morte celular necrótica a partir de venenos de serpentes e suas frações isoladas (DEOLINDO et al., 2005; ADADE et al., 2010; ADADE et al., 2014; MELLO et al., 2017).

Resultados semelhantes contra *T. cruzi* foram recentemente atribuídos à outra viperícidina isolada de *Bothrops atrox* - a batroxícidina (BatxC). O estudo da BatxC também demonstrou a via necrótica de ação anti *T. cruzi* (MELLO et al., 2017).

Demonstrando a heterogeneidade de atividades de PAMs, a melitina, uma catelicidina isolada do veneno da abelha *Apis mellifera*, evidenciou morte celular por apoptose e indução de autofagia em *T. cruzi* (ADADE et al., 2013).

Em 2005, Deolindo e colaboradores também investigaram o efeito tóxico do veneno da *Bothrops jararaca* na DC e objetivaram elucidar o mecanismo de morte induzida pelo veneno. Com uma EC₅₀ de 10µM, os autores conseguiram, a partir de observações ultra-estruturais confirmar a morte induzida por apoptose com modificações nas mitocôndrias, desorganização do cinetoplasto e externalização da fosfatidilserina.

No presente trabalho, a análise estrutural topográfica dos parasitos tratados com Ctn realizada por microscopia eletrônica de varredura demonstrou danos na membrana com extravasamento de material celular e modificações importantes na morfologia do

parasito. Os achados da MEV indicativos de necrose confirmam todos os dados anteriores, uma vez que não é comum lesões de membrana associadas a apoptose (KRYSKO et al., 2008).

Os resultados apresentados também são condizentes com outros trabalhos realizados com venenos totais de *Crotalus* spp. que parecem induzir necrose em *T. cruzi*. ADADE et al. (2010) realizaram estudo semelhante a este, com veneno total de *Crotalus viridis viridis* e observaram atividade antichagásica com mecanismo de morte semelhante ao descrito para a Ctn: aumento de marcação com PI (corante semelhante ao 7-AAD), redução na fluorescência de células marcadas por Rho-123 e microscopia de varredura revelando inchaço nas mitocôndrias, lise de membrana e perda de componentes citoplasmáticos.

Finalmente, as modificações morfológicas e bioquímicas *in vitro* observadas em nosso estudo, como alteração da integridade da membrana, modificações no potencial transmembrânico mitocondrial, aumento de EROS do parasito sugerem que a crotalicidina induz morte por necrose em *T. cruzi*.

O benzonidazol, por sua vez, parece agir alterando o controle oxirredutor das células, causando assim a morte do parasito por indução do estresse oxidativo (MAYA et al., 2007; WAYPA; SMITH; SCHUMACKER, 2016). A ação deste composto sobre o parasito parece estar relacionada ao dano causado pela interação entre radicais livres e macromoléculas do parasito (DOCAMPO, 1990; MAYA et al., 2007). Os achados do presente trabalho confirmam, então, o que já é estabelecido na literatura indicando que o benzonidazol induz a necrose em *T. cruzi* com aumento significativo na produção de EROS e lesão mitocondrial em concentrações muito elevadas devido sua dificuldade de permeação na membrana do parasito.

Os resultados apontam Ctn como substância promissora para tratamento da DC com alto índice de seletividade, atividade nas formas amastigotas intracelulares e melhores resultados *in vitro* que o BZ.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O PAM Crotalicidina demonstrou efeito tripanocida nas três formas de *Trypanosoma cruzi*, com resultados melhores que o benzonidazol nas mesmas condições. O índice de seletividade de Ctn também se mostrou superior, evidenciando baixa toxicidade *in vitro* atribuída ao peptídeo. Na investigação quanto ao mecanismo de morte celular, Ctn parece induzir necrose no parasito com degradação da membrana, produção de radicais livres e alterações no potencial transmembrânico mitocondrial. Mecanismo de morte semelhante foi encontrado para o Benzonidazol. Os peptídeos Cnt [1-14], Cnt [15-34] (oriundos de Ctn) e LL-37 (catelicidina humana) não demonstraram atividade tripanocida *in vitro*.

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.

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**. v. 138, n. 1, p. 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**. v. 138, n. 1, p. 46-58, 2010.

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, C.M. 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, n.11, p.1444-61, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 2013.

- ALMEIDA, R.V. et al. Evaluation of the immunogenicity and in vivo toxicity of the antimicrobial peptide P34. **International journal of pharmaceutics**, v. 421, n. 1, p. 94-98, 2011.
- ATALE, N. et al. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. **Journal of Microscopy**, v. 255, n. 1, p. 7–19, 2014.
- ALTMANN, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr Opin Chem Biol**. v5, p 424-431, 2011.
- ANDRADE, C. M. et al. Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.48, n.6, p.706-715, 2015.
- BARACCA, A. et al . Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. **Biochim Biophys Acta**. v.1606, n. 1, p.137-46, 2003.
- BARKSDALE, S.M.; HRIFKO, E. J.; VAN HOEK, M. L. Cathelicidin antimicrobial peptide from Alligator mississippiensis has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 70, p. 135-144, 2017.
- BANDURSKA, Katarzyna et al. Unique features of human cathelicidin LL-37. **Biofactors**. v. 41, n. 5, p. 289-300, 2015.
- 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.
- 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.

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.E. et al. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 188, p. 643-648, 1980.

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

CASTRO, A.M.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. et al. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**. v. 99, p. 379–383, 2006.

CASTRO D.P. et al. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Exp Parasitol.**;v. 117, n. 2, p.201-207, 2007.

CASTRO, J. et al. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & experimental toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

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**, 2016.

CAUCHARD, S. et al. Killing of Trypanozoon parasites by the equine cathelicidin eCATH1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 60, n. 5, p. 2610-2619, 2016.

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.

CHERKESOVA, T. S. et al. Sequence variation in CYP51A from the y strain of 124 *Trypanosoma cruzi* alters its sensitivity to inhibition. **FEBS Letters**, v. 588, n. 21, p. 3878–3885, 2014.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v432, p829-837, 2004.

CLAYTON J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. 12-15, 2010.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v432, p829-837, 2004.

CONTEH, L.E.; ENGELS T.; MOLYNEUX, D.H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, p. 239–47, 2010.

COURA, J. R. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. **Memórias 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, 2010.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **Journal of ethnopharmacology**. v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

CRACK, L. R. et al. Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. **Clinical and experimental dermatology**, v. 37, n. 5, p. 534-543, 2012.

DE SOUZA, W., DE CARVALHO, T.M.U., BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J. Cell Biol.** doi: 10.1155/2010/295394, 2010.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 18, p. 1337-1347, 2005.

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, J. C. P. et al . II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. esp, p. 7-86, 2016 .

DIAS, J.; COURA. J.. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**: Editora FIOCRUZ. 1997.

DURR, U. H., SUDHEENDRA, U. S. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, 1758(9): 1408-1425, 2006.

ELSBACH, P. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? **Journal of Clinical Investigation**. v. 111, n. 11, p. 1643, 2003.

FALCAO, C. B. et al. 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. et al. 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.

FALCÃO, C. B. et al. 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.

GIRARD, R.M.B.M et al. An Aromatic Diamidine That Targets Kinetoplast DNA, Impairs the Cell Cycle in *Trypanosoma cruzi*, and Diminishes Trypomastigote Release from Infected Mammalian Host Cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 60, n. 10, p. 5867-5877, 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, n. 7, p. 598-602, 2002.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GUO, Xiaoxiao et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1784-1794, 2013.

HASSLOCHER-MORENO A.M. et al. Safety of benzimidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Antimicrob Chemother**. v.67(5):p.1261-6, 2012.

HARDER, J. et al. Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 130, n. 5, p. 1355-1364, 2010.

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

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nature Rev Drug Discov**, v. 1, p. 748, 2002.

JENSSEN, H. et al. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JOHANSSON, J. et al. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3718-3724, 1998.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nature Rev Drug Discov**, v. 1, p. 748, 2002.

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

KINOSHITA-YANAGA, A. T. et al. Accidental infection by Trypanosoma cruzi follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295-298, 2009.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7. ed. Portugal: Mc Graw-Hill, 2007.

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, 2015.

LEWINSOHN, R. Carlos Chagas (1879-1934) :The discovery of Trypanosoma cruzi and of American Trypanosomiasis. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**. v. 73, n. 5, 1979.

LIMA, A.O. et al **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. Técnica e Interpretação**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LIU, Y.; ENGLUND, P. T. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. **Molecular microbiology**. v. 64, n. 3, p. 676-690, 2007.

LIMA, D.B. et al. Antiparasitic effect of Dinoponera quadriceps giant ant venom. **Toxicon**. v.120, p.128-32, 2016.

LUPLERTLOP, N. et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the Aedes aegypti salivary gland, following infection with dengue virus. **PLoS pathogens**. v. 7, n. 1, p.1001252, 2011.

MAJEWSKI, S; MARCINKIEWICZ, M.: The role of antimicrobial peptides in chronic inflammatory skin diseases. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 33, n. 1, p. 6-12, 2016.

MELLO, C.P. et al. Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon**. v. 130, p. 56-62, 2017.

MENEZES, R.R.P.P. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzi* venom. **Natural product communications**, v. 7, n. 1, p. 71-74, 2012.

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.

MAYA, J.D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MCGWIRE, Bradford S.; KULKARNI, Manjusha 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.

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**, v. 2014, 2014.

MONCAYO, Álvaro. Carlos Chagas: biographical sketch. **Acta tropica**, v. 115, n. 1, p. 1-4, 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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

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

OLIVEIRA, M. F. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.

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.

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.

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

RAMOS JR, ALBERTO N.; CARVALHO, Diana Maul de. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1403-1412, 2001.

RAJAO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309-321, 2014.

RASSI, J.R.A. et al., Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

- RASSI, A.J.R. et al., American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 75, p. 91-93, 2012.
- REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International journal of antimicrobial agents**, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.
- REINHOLZ, M.; RUZICKA, T.; SCHAUBER, J. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. **Annals of dermatology**, v. 24, n. 2, p. 126-135, 2012.
- ROGERO, S.O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** v. 6, n. 3, p.317- 320, 2003.
- SANI, M.; SEPAROVIC, F. How membrane-active peptides get into lipid membranes. **Accounts of chemical research**. v. 49, n. 6, p. 1130-1138, 2016.
- SEO, Min-Duk et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.
- SESTI-COSTA R, et al. Ruthenium complex with benzimidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 10, 2014.
- SILVA, C.F. et al. The efficacy of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1863-1869, 2011.
- SCHMUNIS, G. A.; BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. A Tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. v. 2, p. 1-15, 2000.
- SOARES, R. O. A et al. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 381–387, 2011.

SOUZA, Wanderley. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**. v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M.J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Prog. Lipid Res.**, n. 51, p. 149–177, 2012.

TIMM, B.L. et al. In vitro and in vivo biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3720-3726, 2014.

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.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Manole, São Paulo: Monole, 2003, p. 331.

TORRES, A.F. et al. 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.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in parasitology**. v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

WANG, Y. et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. **PLoS One**. v. 3, n. 3217, 2008.

WAYPA, G. B.; SMITH, K. A.; SCHUMACKER, P. T. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. p. 1–14, 2016.

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.

WILKINSON, S.R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

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 in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates**. Weekly Epidemiological Record 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. WHO, 2010.

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

YONAMINE, C.M. et al. Kinetic characterization of gyroxin, a serine protease from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2791-2793, 2012.

ZEMBRUSKI, N.C.L. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Anal. Biochem** , n. 429, p. 79-81, 2012.

ZHAO, H. et al. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. **Peptides**. v.29, p. 1685–169, 2008.

ZINGALES, B. et al. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener- the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, n. 6, p. 811-814, 1997.

APÊNDICE

Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland

Research Article

Cite this article: Bandeira ICJ, Bandeira-Lima D, Mello CP, Pereira TP, De Menezes RRPPB, Sampaio TL, Falcão CB, Rádis-Baptista G, Martins AMC. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0031182017001846>

Received: 13 May 2017

Revised: 10 September 2017

Accepted: 12 September 2017

Key words:

crotalicidin; viperacidin; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; antimicrobial peptide; cathelicidin-like peptide; LL-37

Authors for correspondence:

Alice Maria Costa Martins, E-mail:

martinsalice@gmail.com; Gandhi

Rádis-Baptista, E-mail: radisbra@yahoo.com

Izabel Cristina Justino Bandeira¹, Danya Bandeira-Lima¹,

Clarissa Perdigão Mello¹, Ticiano Praciano Pereira¹,

Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra De Menezes², Tiago Lima Sampaio²,

Cláudio Borges Falcão¹, Gandhi Rádis-Baptista^{1,3} and Alice Maria Costa Martins¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil;

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil and ³Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Cathelicidins are antimicrobial peptides produced by humans and animals in response to various pathogenic microbes. Crotalicidin (Ctn), a cathelicidin-related viperacidin from the South American *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland, and its fragments have demonstrated antimicrobial and antifungal activity, similarly to human cathelicidin LL-37. In order to provide templates for the development of modern trypanocidal agents, the present study evaluated the antichagasic effect of these four peptides (Ctn, Ctn[1-14], Ctn[15-34] and LL-37). Herein, Ctn and short derived peptides were tested against the epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y strain (benznidazole-resistant strain) and cytotoxicity in mammalian cells was evaluated against LLC-MK2 lineage cells. Ctn inhibited all *T. cruzi* developmental forms, including amastigotes, which is implicated in the burden of infection in the chronic phase of Chagas disease. Moreover, Ctn showed a high selective index against trypomastigote forms (>200). Ctn induced cell death in *T. cruzi* through necrosis, as determined by flow cytometry analyses with specific molecular probes and morphological alterations, such as loss of membrane integrity and cell shrinkage, as observed through scanning electron microscopy. Overall, Ctn seems to be a promising template for the development of antichagasic agents.

Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is an important public health problem in Latin America and it is increasingly spreading in other areas. It is estimated that around six million people are affected worldwide and approximately 7000 deaths occur annually (WHO, 2016). The current treatment for Chagas disease includes two nitro-heterocyclic drugs – benznidazole (Bz) and nifurtimox – which are only effective against the parasite in the acute phase of infection. The use of these drugs is limited due to their poor bioavailability and side-effects, such as allergic dermatitis, pruritus and gastrointestinal manifestations among others (WHO, 2016; Chatelain, 2017). These facts highlight an urgent need for the development of more effective and safer drugs to be used alone or in combination with other chemotherapeutic agents for the treatment of Chagas disease.

In the last decades, several antimicrobial peptides (AMPs) have been discovered. AMPs are naturally designed to target the cell membranes of pathogens and are widely seen as a promising alternative to conventional antimicrobials considering the rise in multi-antibiotic resistance (Sani and Separovic, 2016). Cathelicidins comprise one of these AMP families and are characterized by a conserved cathelin domain and a variable C-terminal cationic antimicrobial domain (Wódz and Brzeźnińska-Błaszczuk, 2015). Recently, our research group have found and characterized cathelicidin precursors from the venom gland cDNA libraries of several species of South American pit viper snakes, called viperacidins (Rádis-Baptista, 2015). Crotalicidin (Ctn), a viperacidin from the *Crotalus durissus terrificus*, has shown antibacterial (Falcão *et al.* 2014) and antiproliferative activities against several cancer cell lines (Falcão *et al.* 2015). *In silico* dissection of Ctn yielded the fragments Ctn[1-14] and Ctn[15-34], which were tested to establish to what extent they reproduced the structure and activity of the parent peptide. Indeed, Ctn[15-34] displayed antibacterial, anti-tumour (Falcão *et al.* 2015) and antifungal activity (Cavalcante *et al.* 2016) with very low haemolytic effect (Falcão *et al.* 2015). Recently, Ctn antiviral activity [15-34] was also demonstrated in an *in vitro* model of shrimp haemocytes (Vieira-Girão *et al.* 2017).

The trypanosomicidal activity of animal venom components has been described by other authors (Adade *et al.* 2013; Souza *et al.* 2016). In general, these venom antimicrobial components are amphipathic molecules mainly constituted of positively charged (hydrophilic) and hydrophobic residues, which can interact with and disrupt parasite cell membranes (McGwire and Kulkarni, 2010; Teixeira *et al.* 2012). Thus, the aim of this work was to evaluate

the antichagasic effect of cathelicidin Ctn and its short fragments (Ctn[1–14] and Ctn[15–34]) in comparison with the paradigmatic human cathelicidin LL-37 (hCAP18). Additionally, the main mechanisms of Ctn and Ctn peptides that trigger *T. cruzi* cell death were also investigated.

Materials and methods

Peptides and Bz

Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34] were obtained as described by Falcão *et al.* (2014, 2015). The human cathelicidin LL-37/hCAP18 was synthesized according to Falcão *et al.* (2014). The 1 mM peptide stock solutions were prepared by separately weighing and dissolving the right amount of each peptide in deionized water and kept at 4 °C for up to 6 weeks. Their amino acid sequences were analysed using the 'Peptide property calculator' (<http://www.pepcalc.com>) and 'Heliquet' (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr>) software programmes to obtain some physicochemical properties. Bz (C₁₂H₁₂N₄O₃; MW = 260.249 g mol⁻¹) was obtained from Roche® (Basileia, Switzerland) and stock solutions were prepared with 1000 mM (1 M) of PBS and kept at 4 °C until its use within 6 weeks.

Trypanosoma cruzi and LLC-MK2 cell cultures

The Rhesus monkey kidney cells LLC-MK2 (ATCC CCL-7) were cultured in DMEM medium (Vitrocell, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal calf serum (FBS) and 1% antibiotics (100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin) solution in T-25/75 cm² flasks and were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. These cells were subcultured each time they reached 80–90% of confluence after being harvested with a solution containing 0.25% of trypsin and 2.21 mM EDTA. *Trypanosoma cruzi* Y strain were isolated at the Chemistry Institute, Department of Biochemistry of the University of São Paulo.

Anti-*T. cruzi* activity assay against epimastigote forms

Epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain were added to 96-well plates (10⁶ parasites mL⁻¹) containing 2-fold serial dilutions of Ctn, or Ctn[1–14], or Ctn[15–34], or LL-37 or Bz in liver infusion tryptose medium supplemented with 1% antibiotics (100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin) and 10% of FBS. Final concentration ranges were: peptides at 0.19–100 µM and Bz at 15.6–1000 µM. Parasite 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 only with sterile PBS medium as negative controls (100% viability) and all experiments were carried out in triplicate.

Anti-*T. cruzi* activity assay against trypomastigote forms

T. cruzi trypomastigote forms were obtained by infecting LLC-MK2 cells with trypomastigote forms in T-25/75 cm² flasks at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂ in DMEM medium (Vitrocell, São Paulo, Brazil) supplemented with 1% antibiotics (100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin) and 2% FBS for 24 h. Thereafter, trypomastigote forms were plated (96-well plate) and 2-fold serial dilutions of either peptides or Bz in DMEM were added at the same final concentration ranges used against the epimastigote forms. After 24 h of 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 only with sterile PBS medium as negative controls and all experiments were carried out in triplicate.

Anti-*T. cruzi* activity assay against amastigote forms

LLC-MK2 cells were seeded in 24-well plates (5 × 10⁵ cells/well) containing glass coverslips (13-mm diameter) in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin), and maintained for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Next, the medium 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 Ctn (0.22 or 0.44 µM) or Bz (282 or 564 µM) 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). Non-treated infected LLC-MK2 cells were used as controls. 300 cells were counted in triplicate and intracellular amastigotes per 100 cells and percentage of infected cells were calculated.

Trypanosoma cruzi epimastigote death pathway assays

Flow cytometry experiments were performed to evaluate *T. cruzi* death pathways when treated with Ctn. The epimastigote forms (10⁶ cells mL⁻¹) were treated with Ctn and Bz at their half maximal effective concentration (EC₅₀) concentrations (4.47 and 218 µM, respectively) in liver infusion tryptose medium. After incubation for 24 h at 28 °C, the parasite cells were washed and stained with fluorescein isothiocyanate-annexin V (AX) and/or 7-aminoactinomycin D (7-AAD) according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) to detect cell death by apoptosis or necrosis, respectively. In separate experiments, the loss of mitochondrial transmembrane potential (MTP), the outburst of reactive oxygen species (ROS) and the swelling of reservosomes were also investigated. After the treatment of *T. cruzi* epimastigote forms with Ctn and Bz at their EC₅₀ (4.47 and 218 µM, respectively) for 24 h at 28 °C, the parasites were stained with 10 µg mL⁻¹ rhodamine 123 or 20 mM L⁻¹ dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) or 5 µg mL⁻¹ acridine orange (AO) (Sigma – Aldrich™, St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions, respectively. Next, these cells were run in a FACSCalibur flow cytometer and 10 000 live events were analysed using the Cell Quest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). The results were established by determining the fold change (treated/non-treated cell ratio) of the geometric mean of fluorescence. Epimastigotes without Ctn treatment were used as controls and all experiments were carried out in triplicate.

Cytotoxicity test in mammalian cells (MTT assay)

Cell viability was also measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Vanden Berghe *et al.* 2013). LLC-MK2 cells were plated in DMEM medium, treated with different concentrations of Ctn, Ctn[1–14] and Ctn [15–34] (1.56–100 µM) and incubated at 37 °C for 24 h. MTT (Amresco, Ohio, USA; 5 mg mL⁻¹) was added and the cells were incubated for 4 h, when 10% sodium dodecyl sulphate (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 using cells treated only with sterile PBS medium as negative controls and all experiments were carried out in triplicate. The Selectivity Index (SI) was calculated through the ratio of EC₅₀ of LLC-MK2 cells/EC₅₀ of trypomastigote forms (Nwaka and Hudson, 2006).

Table 1. Amino acid sequence and some physicochemical properties of the peptides

Peptide	One-letter amino acid sequence ^a	Charge ^b	Hydrophobicity, H ^c	Molecular weight ^d
Ctn	KRFKFFKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	+16	0.263	4151.41
Ctn[1–14]	KRFKFFKVKKSV	+9	−0.012	1797.30
Ctn[15–34]	KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	+8	0.455	2371.10
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE	+6	0.201	4493.26

^aCtn and fragments had C-terminal amides.

^bAt neutral pH, from the 'Peptide property calculator' software (<http://www.pepcalc.com>).

^cObtained from the 'Heliquet' software (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr>).

^dPreviously determined (Falcão *et al.* 2015).

Scanning electron microscopy

Epimastigote forms were treated with Ctn peptide at its EC₅₀ (4.47 μM) concentration in liver infusion tryptose medium. After incubation for 12 h at 28 °C, the parasites were washed with PBS and fixed with a 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) solution. After fixation for 2 h at room temperature, parasites were washed with PBS, and then dehydrated with ethanol. Next, samples were dried with CO₂, coated in gold and, finally, observed in a FEI Quanta 450 FEG scanning electron microscope (FEI, Oregon, USA). Digital images were acquired and stored (Lima *et al.* 2016).

Statistical analysis

Three independent experiments were performed in triplicate for all assays. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 programme (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The EC₅₀ values were determined by non-linear regression. Data were analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. Significance was defined as **P* < 0.05.

Results

The obtained peptides with their respective amino acid sequences and physicochemical properties such as net charge, hydrophobicity and molecular weight are shown in Table 1. They were screened against all *T. cruzi* morphological forms to assess and compare their antiprotozoa activities with the standard drug Bz.

Against the epimastigote forms, the only peptide that showed activity against *T. cruzi* within the tested concentration range was Ctn, with an IC₅₀ of 4.47 (±0.9) μM reached after 24 h of incubation, which did not change up to 72 h after treatment. Bz required very high molar concentrations, as expected, against the Y strain (IC₅₀/24 h of 218 ± 15 μM) (Table 2) and could not reach an IC₅₀ value close to Ctn concentrations even after 72 h of treatment (IC₅₀/72 h of 16.5 ± 1 μM).

Against the trypomastigote forms, Ctn and its fragments showed different activities against *T. cruzi*. While Ctn[1–14] and Ctn[15–34] was able to inhibit 50% of the trypomastigotes with concentrations of 33.1 and 9.5 μM, respectively, Ctn only required 0.22 μM to inhibit 50% of that *T. cruzi* morphological form. Next, the cytotoxicity of the peptides to LLC-MK2 cells without the parasites was verified.

T. cruzi amastigote forms inside LLC-MK2 were also treated with Ctn or Bz at their respective EC₅₀s against the trypomastigote forms. According to Fig. 1, Ctn significantly reduced the number of amastigotes for each 100 LLC-MK2 cells when compared to untreated infected cells (control) after 24 h of incubation (Fig. 1A). In addition, Ctn at 0.22 μM significantly reduced the percentage of infected LLC-MK2 cells when compared to the control after 48 h of treatment (Fig. 1B). Similar results were also observed with Bz at 282 μM.

In addition, flow cytometry analyses and scanning electron microscopy (SEM) were performed to evaluate the death pathway(s) of *T. cruzi* epimastigote forms. After 24 h of treatment with Ctn at 4.4 μM (EC₅₀), the remaining live epimastigotes were mainly labelled with either 7-AAD only (41.6%) or 7-AAD and AX (39.6%) markers, which indicate cell death by necrosis or necrosis/late apoptosis, respectively (Fig. 2). Bz was able to increase the labelling with 7-AAD and AX (8.0%) and more significantly the labelling with 7-AAD only (65.6%) on epimastigotes treated with the EC₅₀ after 24 h (Supplementary Fig. S1A).

Additional flow cytometry experiments (Fig. 3) were then carried out to clarify the epimastigote death pathway, such as the generation of ROS and the loss of MTP. In Fig. 3A, Ctn at 4.47 μM for 24 h induced a burst of ROS, increased DCFH-DA signal (shift to the right), by as much as 3-fold when compared to untreated parasites (control). In a separate assay, a reduction in MTP was observed, decreasing rhodamine 123 signal by 50% (shift to the left), when the epimastigotes were treated with Ctn at the EC₅₀ compared to non-treated *T. cruzi* (Fig. 3B). Bz showed a similar profile, decreasing MTP by approximately 30% and increasing by 70% ROS generation in epimastigotes treated with the EC₅₀ after 24 h (Supplementary Fig. S1B–C).

Table 2. EC₅₀ values (in μM) and Selectivity Index (SI) to trypomastigote forms of the peptides and Bz against epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y strain and LLC-MK2 mammalian cells

	Ctn	Ctn[1–14]	Ctn[15–34]	LL-37	Bz
Epimastigote 24 h	4.47 ± 0.9	>100	>100	>100	218.0 ± 15
48 h	4.37 ± 0.5	>100	>100	>100	61.1 ± 3
72 h	6.21 ± 0.4	>100	>100	>100	16.5 ± 1
Trypomastigote	0.22 ± 0.02	33.1 ± 15	9.5 ± 2	>100	282 ± 20
LLC-MK2	44.7	>100	>100	>100	614.8 ± 30
SI	203.2	>3	>10.5	nd	2.18

Data are expressed as means ± s.e.m. of triplicate of three independent experiments (nd: not determined).

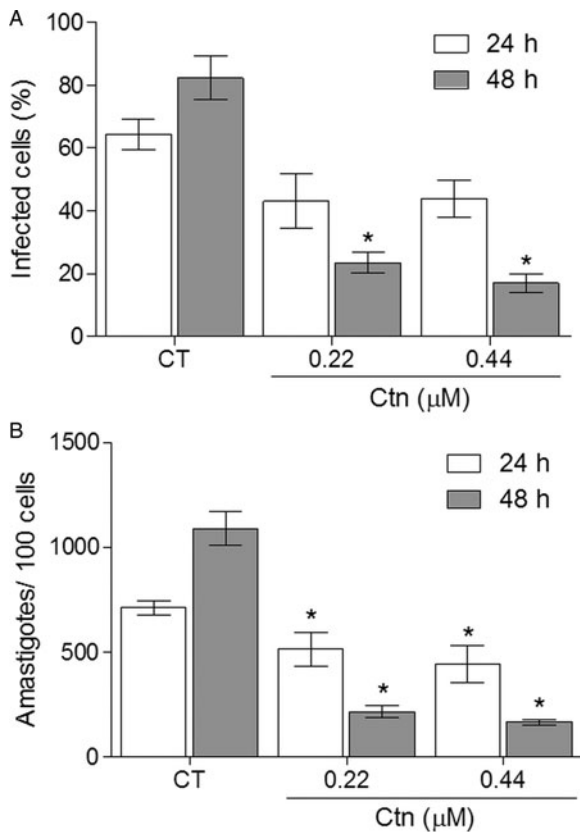


Fig. 1. Effect of crotalicidin on intracellular amastigotes in infected cells (A) amastigote/100 cells (B) at 24 and 48 h of incubation (CT - control treated with PBS; * $P < 0.05$).

We also investigated an alternative cell death pathway, the autophagy, utilizing AO staining to evaluate the increase of acidic vesicles, the reservosomes. However, after 24 h, epimastigote forms treated with Ctn at the EC_{50} did not show any increase in the AO fluorescent signal compared to the control group (Supplementary Fig. S2), neither did Bz (Supplementary Fig. S1D).

Based on the abovementioned results, which provided an insight that Ctn kills *T. cruzi* by inducing necrosis and late apoptosis, SEM images (Fig. 4) were acquired to visualize the morphological alterations and, thus corroborate the flow cytometry findings. Compared to a non-treated *T. cruzi* epimastigote (Fig. 4A), parasites treated for 12 h with Ctn at the EC_{50} showed

cell shrinkage (Fig. 4B) and loss of membrane integrity with the presence of pores (Fig. 4C–D).

Discussion

In this present study, we assessed the potential anti-*T. cruzi* activity of full-size Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34] short Ctn derivatives and LL-37 against all parasite morphological forms and compared them with Bz, a commercially available antichagasic drug of choice, as well as studied the death pathway(s) induced by the most promising biologically active peptide. Against the epimastigotes, Ctn was the only peptide that showed activity at the tested concentration range. By observing the physicochemical properties of the analysed peptides, it seems that both bulky and highly positively charged peptides are required for anti-*T. cruzi* activity against the epimastigote forms. Similar results against *T. cruzi* were previously reported with the use of batroxicidin (BatzC), a viperidicin from *Bothrops atrox* that has a molecular weight of 4258.63 and net charge of +16 (Falcao *et al.* 2014; Mello *et al.* 2017). In addition, after 24 h of treatment, Ctn EC_{50} (4.47 μM) was more than one order of magnitude lower than Bz IC_{50} (218 μM), which did not reach values close to the peptide even after 72 h of incubation.

The peptides were also evaluated against trypomastigotes and amastigotes. These *T. cruzi* morphological forms were obtained after infecting LLC-MK2 kidney cells, which have been used for more than 30 years as mammalian cell models of *T. cruzi* infection (Andrews and Colli, 1982; Zingales *et al.* 1982; Zingales *et al.* 1997). Interestingly, while the *in vitro* Bz concentration killed 50% of the trypomastigotes (282 μM), it essentially did not change when compared to epimastigotes after 24 h of incubation. In contrast, the Ctn EC_{50} against the trypomastigote forms (0.22 μM) showed a 20-fold lower effect against epimastigotes (4.47 μM). Moreover, Ctn at 0.22 μM also significantly reduced the number of amastigotes and the percentage of infected LLC-MK2 cells when compared to non-treated infected cells. Therefore, *T. cruzi* trypomastigote and amastigote forms seem to be more susceptible to Ctn than epimastigotes. This increased susceptibility can be related to the prevalence of negatively charged molecules on the parasite cell membrane, especially in trypomastigote forms, such as mucin glycoproteins and sialic acid, which are implicated in host–parasite interactions (de Souza *et al.* 2010). These anionic molecules made *T. cruzi* trypomastigote forms susceptible even to Ctn[1–14] and Ctn[15–34] fragments, which have only half of the net charge of Ctn, particularly the mid-sized and highly hydrophobic Ctn[15–34].

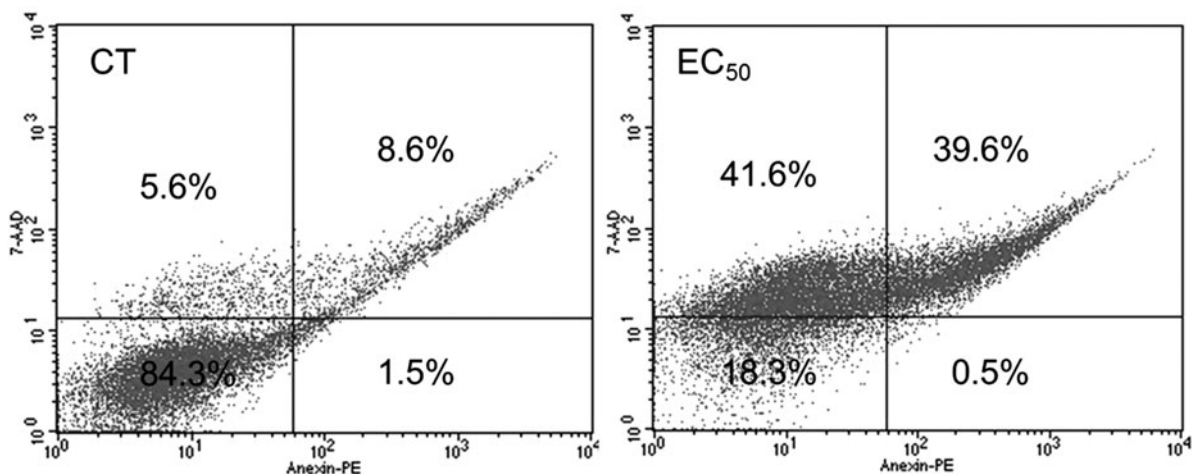


Fig. 2. Representative flow cytometry scattering graphs of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes treated with crotalicidin at 4.47 μM for 24 h. Percentage values are averages of 10 000 live events from three independent experiments (CT - control treated with PBS).

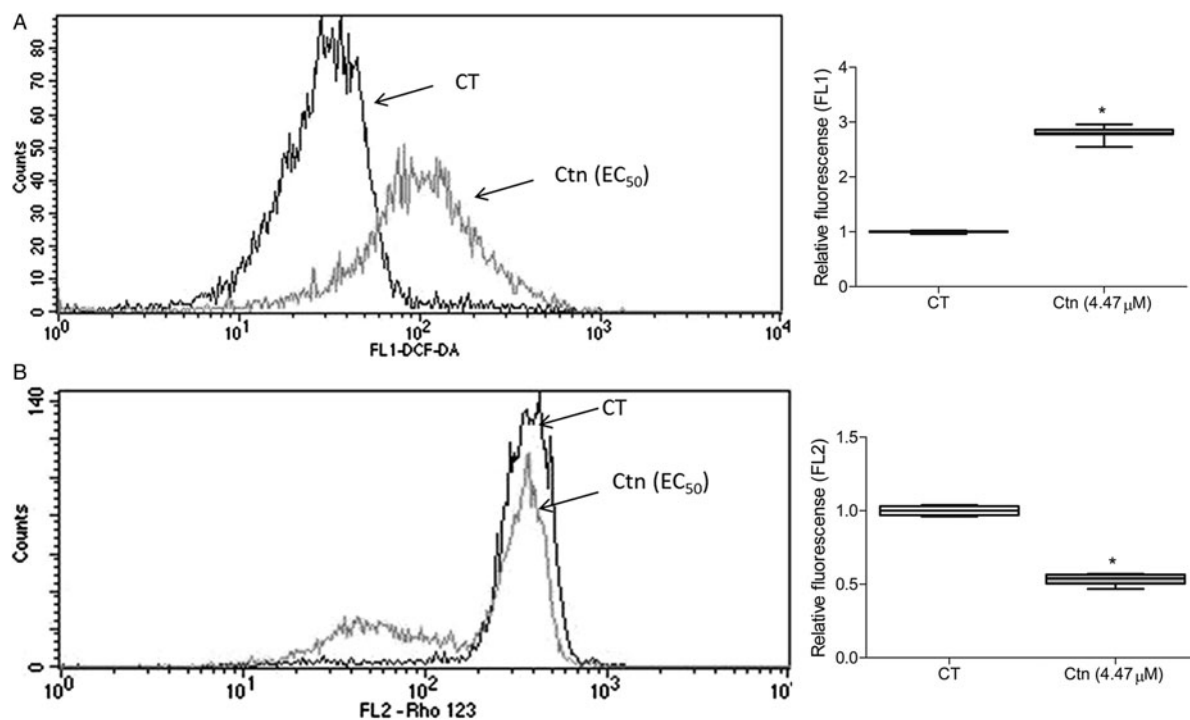


Fig. 3. A representative histogram of DCFH-DA fluorescent signal and relative fluorescence values (from three independent experiments) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes that were initially treated with crotalidicin at $4.47 \mu\text{M}$ for 24 h (A) and a representative histogram of rhodamine 123 (Rho 123) fluorescent signal and relative fluorescence values (from three independent experiments) from *T. cruzi* epimastigotes initially treated with crotalidicin at $4.47 \mu\text{M}$ for 24 h (B) (CT – control treated with PBS).

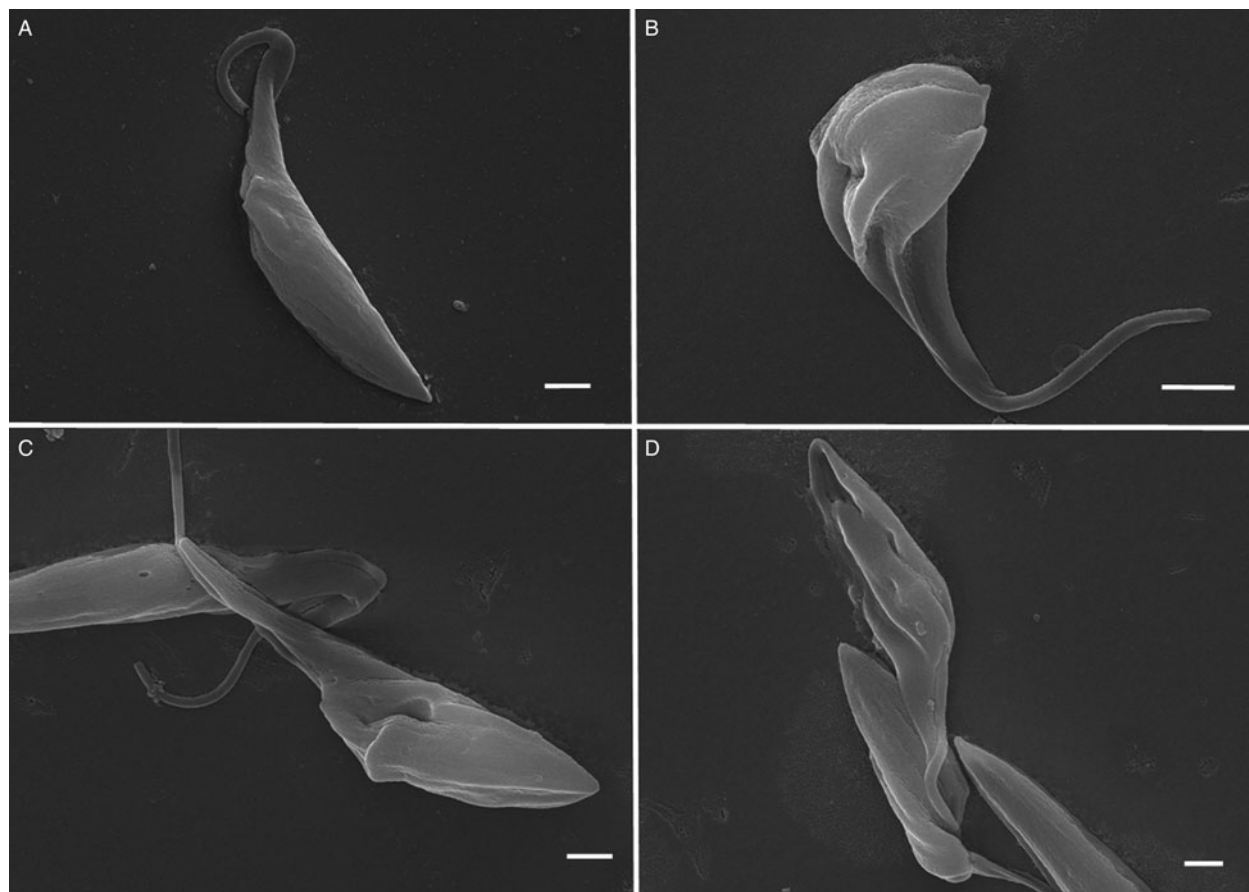


Fig. 4. Scanning electron microscopy of control epimastigotes (A) and treated epimastigotes with EC_{50} of crotalidicin (B–D). Morphological alterations were observed, such as cell shrinkage (B) and membrane integrity loss (C–D). Scale bars: $1 \mu\text{m}$.

The cytotoxicity of the drugs (peptides and Bz) against uninfected LLC-MK2 cells was also verified. Considering the IC₅₀ concentrations against trypomastigotes, Ctn showed the greatest selectivity (SI = 203.2) among the other peptides and Bz. Furthermore, Ctn met two important criteria for a potential anti-*T. cruzi* drug candidate to be considered as a success and, thus, the most promising evaluated peptide: trypomastigote IC₅₀ below 1 µg mL⁻¹ (0.22 µM or 0.913 µg mL⁻¹) and SI above 50 (Nwaka and Hudson, 2006). Furthermore, the Ctn selectivity against parasite-infected cells seems to be another advantage for the clinical development of target therapy for *T. cruzi* infection.

The necrotic pathway observed in Ctn was also observed when the epimastigotes were treated with the viperidicin BatxC at the EC₅₀ (Mello et al. 2017). *Trypanosoma cruzi* cell death by apoptosis and autophagy was also observed when other AMPs were used, such as melittin (Adade et al. 2013).

Cathelicidins are typically potent trypanolytic AMPs. Similar peptides such as cathelicidins SMAP-29 and protegrin-1 have been tested in the intraperitoneal route and showed interesting results, such as decrease in parasitaemia and prolonged survival of mice infected with *Trypanosoma brucei* (McGwire et al. 2003). The evaluation of Bz-induced cell death in epimastigote forms also showed a necrotic profile, meaning Ctn is promising as a template for the designing of a new antichagasic agent, because it has a similar cell death profile to the reference drug and an almost 10-fold higher selective index.

In conclusion, Ctn, a cathelicidin-related peptide obtained from the venom gland of *C. durissus terrificus* rattlesnake, not only has antibacterial and anti-tumour properties but also exhibited anti-*T. cruzi* activity against all morphological forms of a Bz-resistant strain. In addition, Ctn killed the epimastigote parasite form by inducing necrosis. Remarkably, when toxicity to healthy mammalian cells was compared, the peptide's greater selectivity for *T. cruzi* when compared to Bz makes Ctn a promising drug candidate or a lead for the development of new peptide-based drugs to treat Chagas disease.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182017001846>

Acknowledgements. C.B. Falcão 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 Ceará. The authors also thank Analytic Centre – UFC/CT – INFRA/Pro – Equipamento CAPES.

Financial support. This research study was partially supported by the Toxinology Program (Issue 2010), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Ministry of Education and Culture (MEC) of the Federal Government of Brazil, granted to Prof G. Rádis-Baptista.

References

- Adade CM, Oliveira IR, Pais JA and Souto-Pradrón T (2013) Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* **69**, 227–239.
- Adade CM, Carvalho AL, Tomaz MA, Costa TF, Godinho JL, Melo PA, Lima AP, Rodrigues JC, Zingali RB and Souto-Pradrón T (2014) Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, e3252.
- Andrews NW and Colli W (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *Journal of Protozoology* **29**, 264–269.
- Cavalcante CS, Falcão CB, Fontenelle RO, Andreu D and Rádis-Baptista G (2016) Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **70**, 231–237.
- Chatelain E (2017) Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal* **15**, 98–103.
- De Souza W, De Carvalho TMU and Barrias ES (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cell Biology* **2010**, 295394. doi: 10.1155/2010/295394.
- Falcão CB, de La Torre BG, Pérez-Peinado C, Barron AE, Andreu D and Rádis-Baptista G (2014) Viperidicins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* **46**, 2561–2571.
- Falcão CB, Pérez-Peinado C, de la Torre BG, Mayol X, Zamora-Carreras H, Jiménez MÁ, Rádis-Baptista G and Andreu D (2015) Structural dissection of crotalicidin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with antimicrobial and antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **58**, 8553–8563.
- Lima DB, Sousa PL, Torres AF, Rodrigues KA, Mello CP, Menezes RR, Tassarolo LD, Quinet YP, de Oliveira MR and Martins AM (2016) Antiparasitic effect of Dinoponera quadriceps giant ant venom. *Toxicon* **120**, 128–132.
- McGwire BS and Kulkarni MM (2010) Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology* **126**, 397–405.
- McGwire BS, Olson CL, Tack BF and Engman DM (2003) Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *Journal of Infectious Diseases* **188**, 146–152.
- Mello CP, Lima DB, Menezes RR, Bandeira IC, Tassarolo LD, Sampaio TL, Falcão CB, Rádis-Baptista G and Martins AM (2017) Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicon* **130**, 56–62.
- Nwaka S and Hudson A (2006) Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**, 941–955.
- Rádis-Baptista G (2015) Viperidicins, snake venom cathelicidin-related peptides, in the milieu of reptilian antimicrobial polypeptides. In *Snake Venoms*. Gopalakrishnakone P, Inagaki H, Mukherjee AK, Rahmy Carl-Wilhelm Vogel TR (eds). The Netherlands: Springer, pp. 1–25.
- Rodrigues JH, Ueda-Nakamura T, Corrêa AG, Sangi DP and Nakamura CV (2014) A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benzimidazole, against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* **9**, e85706.
- Sani MA and Separovic F (2016) How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Accounts of Chemical Research* **49**, 1130–1138.
- Souza AL, Faria RX, Calabrese KS, Hardoim DJ, Taniwaki N, Alves LA and De Simone SG (2016) Temporizin and temporizin-1 peptides as novel candidates for eliminating *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* **11**, e0157673.
- Teixeira V, Feio MJ and Bastos M (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **51**, 149–177.
- Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N and Vandebeele P (2013) Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* **61**, 117–129.
- Vieira-Girão PR, Falcão CB, Rocha IR, Lucena HM, Costa FH and Rádis-Baptista G (2017) Antiviral activity of Ctn[15–34], A cathelicidin-derived eicosapeptide, against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei* primary hemocyte cultures. *Food and Environmental Virology*. doi: 10.1007/s12560-017-9285-5. [Epub ahead of print].
- Wódz K and Brzezińska-Błaszczyk E (2015) Cathelicidins – endogenous antimicrobial peptides. *Postepy Biochemii* **61**, 93–101.
- World Health Organization (WHO) (2016) 'Chagas disease (American trypanosomiasis)'. Fact sheet N° 340 Updated March 2016. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- Zingales B, Andrews NW, Kuwajima VY and Colli W (1982) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Molecular & Biochemical Parasitology* **6**, 111–124.
- Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, Macedo A and Souto RP (1997) Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener – the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**, 811–814.