

**CAMILA MARQUES ADADE**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO VENENO (TOTAL E  
FRAÇÕES) DA SERPENTE *Crotalus viridis viridis*  
SOBRE A MORFOLOGIA, PROLIFERAÇÃO E  
INFECTIVIDADE DO *Trypanosoma cruzi***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

**Orientador: Thaís Cristina Baeta Soares Souto-Padrón**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES

RIO DE JANEIRO  
JULHO DE 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



# UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes  
Coordenação de Pós-graduação

## ATA DA DEFESA DE TESE DO PROGRAMA EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA) PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA)

REALIZADA EM: 30 de Julho de 2010.

CANDIDATO(A): CAMILA MARQUES ADADE

**BANCA EXAMINADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Thaís Cristina Baeta Soares Souto-Pradrón (Presidente da Banca)  
Prof<sup>ª</sup>. Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes  
Prof<sup>ª</sup>. Juliany Cola Fernandes Rodrigues  
Prof<sup>ª</sup>. Solange Lisboa de Castro  
Prof<sup>ª</sup>. Marta Helena Branquinha de Sá (Revisor)

**TÍTULO DA TESE:** "Avaliação dos efeitos do veneno (total e frações) da cobra *Crotalus viridis viridis* sobre a morfologia, proliferação e infectividade do *Trypanosoma cruzi*".

**LOCAL:** Auditório da Biblioteca Central, Bloco L do CCS, UFRJ

**HORA DE INÍCIO:** 09:00 horas

Em sessão pública, após a exposição de cerca de 60 minutos, o(a) candidato(a) foi argüido(a) oralmente pelos membros da Banca, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema de sua Tese "Avaliação dos efeitos do veneno (total e frações) da cobra *Crotalus viridis viridis* sobre a morfologia, proliferação e infectividade do *Trypanosoma cruzi*", sendo Aprovado(a) por unanimidade pelos membros da Banca que conferiram os seguintes graus:

Prof <sup>ª</sup> . Thaís Cristina Baeta Soares Souto-Pradrón (Presidente da Banca)	Grau..10...	Conceito...A
Prof <sup>ª</sup> . Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes	Grau..10...	Conceito...A
Prof <sup>ª</sup> . Juliany Cola Fernandes Rodrigues	Grau..10...	Conceito...A
Prof <sup>ª</sup> . Solange Lisboa de Castro	Grau..10	Conceito...10A
Prof <sup>ª</sup> . Marta Helena Branquinha de Sá (Revisora)	Grau..10	Conceito...A
	Grau Final...10	Conceito Final...A

Na forma regulamentar foi lavrada a presente Ata que é assinada pelos membros da Banca, e pelo(a) candidato(a).

Rio de Janeiro, 30 de Julho de 2010.

Orientadora:   
Prof<sup>ª</sup>. Thaís Cristina Baeta Soares Souto-Pradrón

Prof<sup>ª</sup>. Thaís Cristina Baeta Soares Souto-Pradrón  
(Presidente da banca)

Prof<sup>ª</sup>. Angela Hampshire de Carvalho Santos  
Lopes

Prof<sup>ª</sup>. Juliany Cola Fernandes Rodrigues

Prof<sup>ª</sup>. Solange Lisboa de Castro

Prof<sup>ª</sup>. Marta Helena Branquinha de Sá (Revisor)

Coordenadora:   
Prof<sup>ª</sup>. Ana Paula Vieira Colombo

Candidato(a):   
Camila Marques Adade

Centro de Ciências da Saúde – Rua Carlos Chagas Filho, n.º 3737 – Bloco I  
Cidade Universitária – Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – RJ  
CEP 21.941-590 – Caixa Postal n.º 68.040 – Tel/Fax.: (21) 2560-8344 / 2560-8028  
E-mail: posgrad@micro.ufrj.br

## FICHA CATALOGRÁFICA

Adade, Camila Marques

Avaliação dos efeitos do veneno (total e frações) da serpente *Crotalus viridis viridis* sobre a morfologia, proliferação e infectividade do *Trypanosoma cruzi*/ Camila Marques Adade – Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, 2010.

xxii, 155f.

Orientadora: Thaís Souto-Padrón

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2010.

Referências bibliográficas: f. 98 - 126

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Doença de Chagas 3. Quimioterapia 4. *Crotalus viridis viridis* 5. Microscopia eletrônica 6. Citometria de fluxo 7. HPLC 8. Espectrometria de massas I. Souto-Padrón, Thaís. II. UFRJ/ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia), 2010. III. Avaliação do efeito dos efeitos do veneno total e suas frações componentes da serpente *Crotalus viridis viridis* sobre a proliferação, ultraestrutura e infectividade do *Trypanosoma cruzi*.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do(a) Prof<sup>a</sup>. Thaís Souto-Padrón.

A Thaïs, minha orientadora, um exemplo ímpar de ser humano e de alguém que realmente ama o que faz. Você se tornou, a cada dia, uma fonte de inspiração com toda a sua força e vontade de ser sempre melhor. Muito obrigada por todas as oportunidades, credibilidade e principalmente, obrigada por uma das maiores lições que tive na minha vida.

*De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos  
antes de terminar...  
Façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!*

**Fernando Sabino**

Aos meus pais, Cicleia e Alberto, os maiores incentivadores de tudo!  
Vocês são os responsáveis por tudo o que já fui capaz de realizar e por me  
fazerem sempre acreditar que tudo no final sempre dará certo. Vocês são o  
meu chão, a minha vida. Obrigada por tudo. Amo vocês *ad infinitum*.

*Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.*

**Ricardo Reis**

Ao André, que além de meu marido é também o meu melhor amigo, meu ombro. Você sabe quanto foi importante para a realização desta tese, uma etapa tão importante nas nossas vidas. Espero que você consiga mensurar o quanto eu sou grata por todo o seu apoio e compreensão. Amo você “a perder de vista”.

*Amar: Fechei os olhos para não te ver e a minha boca para não dizer... E dos meus olhos fechados desceram lágrimas que não enxuguei, e da minha boca fechada nasceram sussurros e palavras mudas que te dediquei....*  
*O amor é quando a gente mora um no outro.*

**Mário Quintana**

Ao meu irmão Alberto, a minha prima Mariana e minha avó Miranil, por todos os dias que compartilhamos, mesmo à distância, e a eterna torcida de você por novas conquistas. A luz de vocês torna a minha vida muito mais fácil e plena, difícil imaginar a ausência deste time que está sempre comigo. Amo vocês!!

*Outros outubros virão*  
*Outras manhãs plenas de sol e de luz*  
**Fernando Brant**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente nesta pesquisa. Um especial agradecimento a todos os integrantes do IMPPG que muito contribuíram no meu trabalho e que já fazem parte de muitas lembranças e realizações.

Aos auxiliares técnicos Bosco Carlos, Edna Lúcia dos Santos Rocha e Lusinete da Rocha Bonfim que muito contribuíram e possibilitaram o meu trabalho de bancada. O bom trabalho de vocês foi fundamental.

Aos secretários da pós-graduação do IMPPG, Safira Farache, Igor S. S. Martins e Luciana S. Soares, por toda a ajuda mais do que essencial com os trabalhos burocráticos realizados durante o período de execução desta tese.

A Dra. Rosângela Soares e ao Dr. Antônio F. Pereira o meu muito obrigado pelas ajudas, muitas vezes indiretas, que muito colaboraram com meu aprendizado e desenvolvimento.

A Dra. Marta Helena Branquinho, por ter se dedicado à minuciosa revisão desta tese, contribuindo com excelentes sugestões e muitas inserções neste trabalho. Às Dras. Ângela H. Lopes e Juliany C. Rodrigues por terem aceitado participar da minha defesa e principalmente, por toda as ajudas e toques durante todos os anos de execução deste trabalho e de minha estada na UFRJ. A boa ciência é feita por pessoas especiais como vocês.

Ao Marcos e Venício pela disponibilidade e apoio durante as incontáveis horas na microscopia. Muito obrigado por toda a ajuda e todos os papos que tanto fizeram com que o meu trabalho se tornasse mais fácil.

Ao Prof. Paulo Melo por todos os ensinamentos, ótimos papos e principalmente, por ter, desde sempre, me aberto as portas do seu lab com tanta disponibilidade. O Sr. é um exemplo de excelente pesquisador e humildade. Muito do que está escrito hoje neste tese se deve a toda esta disponibilidade, muito obrigada. À toda equipe do Laboratório de Farmacologia das Toxinas e Substâncias Antagonistas, em especial ao Bruno L. Cons e ao Marcelo A. Tomáz por terem contribuído diretamente com a realização de alguns dos resultados desta tese. Muito obrigada por terem sido extremamente profissionais, além de terem se tornado ótimos colegas de “ralação”. Aos

demais integrantes: Marquinho, Marcelo Strauch, Camila, Paula, Glauco e Fabrício pelos ótimos papos no lab e principalmente, no XVI ISTx onde a companhia de vocês fez tudo ser tão bom. Valeu!!

A toda equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer pelas incontáveis contribuições ao desenvolvimento desta tese.

Ao prof. Ulysses Lins pelos ótimos papos, boas risadas e toda a contribuição a realização desta tese, e principalmente, por fazer do seu lab uma extensão da nossa bancada de trabalho. E da mesma forma, um muuiitttoo obrigada a toda sua equipe, em especial a Fernanda, a Karen e ao Fernando, por fazerem com que esta filosofia seja sempre seguida a risca. Valeu pelas dicas, ajudas, papos e ótimas festinhas!

A Prof<sup>a</sup>. Lina Zingali, meu muito obrigado MAIÚSCULO!!! Você permitiu que eu continuasse acreditando neste trabalho e foi fundamental pra realização desta tese. Da mesma forma, Aninha, você foi uma das pessoas que mais possibilitaram a execução de tantas etapas e a produção de vários dos resultados aqui apresentados. Muuiittoo obrigada pela disponibilidade, os ensinamentos, a paciência e a primazia pela qualidade! Você é mil!!!! Minha toda gratidão também a todos do UEMP pelas ajudas, pela pronta solução das minhas eternas dúvidas, por sempre aturarem as minhas perguntas do tipo “até que horas vai ter gente aqui?”, vocês todos foram demais! Difícil achar palavras pra agradecer por tudo o que aprendi aí. Ah, não posso mesmo deixar de agradecer demais a Brigitte, SINISTRA D+!!!

Bom, tenho que começar os agradecimentos ao pessoal do lab. Espero conseguir expressar aqui todos os “sentimentos de mundo”... Gabi, “minha” aluna, muito obrigada por ter me ajudado em tantas coisas, ter sido competente e principalmente, ter aturado os meus momentos de insanidade. Você tem muito potencial! Anne “Maria”, muito obrigada por todas as milhares de ajudas, as ótimas conversas, as incontáveis risadas, as cervas, ou seja, muito obrigada por todo estes anos super especiais de lab, onde você foi, com toda a certeza, uma das pessoas que fez com este período de quatro anos fosse tão especial. Roberta, você não faz idéia o quanto é especial. Eu, sinceramente, não sei como te agradecer por tanta coisa, tanto “perrengue” que você dividiu comigo, e pela disponibilidade que poucas pessoas neste mundo conseguem ter... Querida, você é luz, nunca se esqueça disso. Moara (mais conhecida como

MARMOTA), só posso te agradecer dizendo o quanto amo a sua amizade e o quanto a sua presença em minha vida é essencial. Espero tê-la sempre por perto ouvindo ótimas músicas, devaneando sobre sonhos, rindo, chorando, discutindo ciência, aprontando e principalmente, fazendo isso tudo ao mesmo tempo com um copo na mão... Você é o fino da bossa. Não posso deixar também, de agradecer a Cyntia que tanto agregou durante o período em que ficou conosco. Muito obrigada por tudo! E, ah, no heart feelings.....

Não posso deixar nunca de agradecer ao Maurilio, mais que uma pessoa que tanto me ensinou, alguém que sempre acreditou neste projeto, e principalmente, que sempre acreditou em mim. Espero nunca desapontá-lo. Muito obrigada! Da mesma forma, a Solange L. de Castro, pessoa linda no sentido *strictu* da palavra. Ótima professora e uma querida amiga, aprendi demais durante todos esses anos, mesmo a distância. Obrigada!!!

Augusto e Juliana, tenho certeza que mesmo se eu um dia tivesse tido a chance de escolher, nunca teria escolhido cunhas tão especiais como vocês. Muito obrigada por todos as nossas ótimas conversas, as bagunças, as milhares de risadas, e a certeza de que a minha vida só ficou melhor com a presença de vocês. Ju, além disso tudo, se não fosse por você, como eu arrumaria a sobrinha mais gostosa, mais amada e com os olhos mais azuis deste mundo? Augusto, se você não tivesse “escolhido” o André, onde eu ficaria no meio disso tudo? Também tenho que agradecer demais as Marias Isabéis da minha vida. Minha sogra, por toda a força, todos os exemplos e principalmente, por sempre apoiar meus passos. A minha vó, que tenho certeza que se não fosse por você, a minha vida estaria de forma muito diferente, e ainda bem que não está. Sou grata a você pra sempre!!!!

Aos meus tios mais queridos, Ana, Ivana, Gricéia, Pamapolha e Hudson, vocês não imaginam o orgulho que eu tenho em fazer parte da vida de vocês. Vocês merecem o que há de melhor no universo. Amo a nossa história.

E, por fim, tenho que agradecer infinitamente pelo apoio dos meus amigos. Lú, Miau, Marcinha, Pati, Yara, Xuxu e Fa, obrigado por existirem e serem, cada um a sua maneira, da forma que são.

*“Um dia de chuva é tão belo quanto um dia de sol. Ambos existem, cada um como é.”*

## UMA TESE É UMA TESE

Mario Prata

Crônica publicada no jornal O Estado de Sao Paulo, 7 de outubro de 1998.

*Sabe tese, de faculdade? Aquela que defendem? Com unhas e dentes? É dessa tese que eu estou falando. Você deve conhecer pelo menos uma pessoa que já defendeu uma tese. Ou esteja defendendo. Sim, uma tese é defendida. Ela é feita para ser atacada pela banca, que são aquelas pessoas que gostam de botar banca.*

*As teses são todas maravilhosas. Em tese. Você acompanha uma pessoa meses, anos, séculos, defendendo uma tese. Palpitantes assuntos. Tem tese que não acaba nunca, que acompanha o elemento para a velhice. Tem até teses pós-morte. O mais interessante na tese é que, quando nos contam, são maravilhosas, intrigantes. A gente fica curiosa, acompanha o sofrimento do autor, anos a fio. Aí ele publica, te dá uma cópia e é sempre - sempre - uma decepção. Em tese. Impossível ler uma tese de cabo a rabo. São chatíssimas. É uma pena que as teses sejam escritas apenas para o julgamento da banca circumspecta, sisuda e compenetrada em si mesma. E nós? Sim, porque os assuntos, já disse, são maravilhosos, cativantes, as pessoas são inteligentíssimas. Temas do arco-da-velha. Mas toda tese fica no rodapé da história. Pra que tanto sic e tanto apud? Sic me lembra o Pasquim e apud não parece candidato do PFL para vereador? Apud Neto.*

*Escrever uma tese é quase um voto de pobreza que a pessoa se autodecreta. O mundo pára, o dinheiro entra apertado, os filhos são abandonados, o marido que se vire. Estou acabando a tese. Essa frase significa que a pessoa vai sair do mundo. Não por alguns dias, mas anos. Tem gente que nunca mais volta. E, depois de terminada a tese, tem a revisão da tese, depois tem a defesa da tese. E, depois da defesa, tem a publicação. E, é claro, intelectual que se preze, logo em seguida embarca noutra tese. São os profissionais, em tese. O pior é quando convidam a gente para assistir à defesa. Meu Deus, que sono. Não em tese, na prática mesmo. Orientados e orientandos (que nomes atuais!) são unânimes em afirmar que toda tese tem de ser - tem de ser! - daquele jeito. É pra não entender, mesmo. Tem de ser formatada assim. Que na Sorbonne é assim, que em Coimbra também. Na*

*Sorbonne, desde 1257. Em Coimbra, mais moderna, desde 1290. Em tese (e na prática) são 700 anos de muita tese e pouca prática.*

*Acho que, nas teses, tinha de ter uma norma em que, além da tese, o elemento teria de fazer também uma tesão (tese grande). Ou seja, uma versão para nós, pobres teóricos ignorantes que não votamos no Apud Neto. Ou seja, o elemento (ou a elementa) passa a vida a estudar um assunto que nos interessa e nada. Pra quê? Pra virar mestre, doutor? E daí? Se ele estudou tanto aquilo, acho impossível que ele não queira que a gente saiba a que conclusões chegou. Mas jamais saberemos onde fica o bicho da goiaba quando não é tempo de goiaba. No bolso do Apud Neto? Tem gente que vai para os Estados Unidos, para a Europa, para terminar a tese. Vão lá nas fontes. Descobrem maravilhas. E a gente não fica sabendo de nada. Só aqueles sisudos da banca. E o cara dá logo um dez com louvor. Louvor para quem? Que exaltação, que encômio é isso?*

*E tem mais: as bolsas para os que defendem as teses são uma pobreza. Tem viagens, compra de livros caros, horas na Internet da vida, separações, pensão para os filhos que a mulher levou embora. É, defender uma tese é mesmo um voto de pobreza, já diria São Francisco de Assis. Em tese. Tenho um casal de amigos que há uns dez anos prepara suas teses. Cada um, uma. Dia desses a filha, de 10 anos, no café da manhã, ameaçou:*

- - Não vou mais estudar! Não vou mais na escola.
- Os dois pararam - momentaneamente - de pensar nas teses.
- - O quê? Pirou?
- - Quero estudar mais, não. Olha vocês dois. Não fazem mais nada na vida. É só a tese, a tese, a tese. Não pode comprar bicicleta por causa da tese. A gente não pode ir para a praia por causa da tese. Tudo é pra quando acabar a tese. Até trocar o pano do sofá. Se eu estudar vou acabar numa tese. Quero estudar mais, não. Não me deixam nem mexer mais no computador. Vocês acham mesmo que eu vou deletar a tese de vocês?
- Pensando bem, até que não é uma má idéia!

## RESUMO

Camila Marques Adade

### AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO VENENO (TOTAL E FRAÇÕES) DA SERPENTE *Crotalus viridis viridis* SOBRE A MORFOLOGIA, PROLIFERAÇÃO E INFECTIVIDADE DO *Trypanosoma cruzi*

Orientadora: Thaís Souto-Padrón

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Os venenos de animais são misturas complexas de diferentes moléculas com alto valor terapêutico. Esta tese mostra que o veneno bruto da cobra *Crotalus viridis viridis* (Cvv), inibe a proliferação de epimastigotas, lisa formas tripomastigotas, além de agir sobre o ciclo intracelular do *T. cruzi*, em concentrações não tóxicas às células hospedeiras. Este trabalho também buscou identificar as frações presentes no veneno de Cvv responsáveis por seus efeitos tripanocidas. O tratamento com o veneno bruto de Cvv resultou em uma redução no número de parasitos, onde os valores de DL<sub>50</sub>/24h de inibição da proliferação dos epimastigotas e lise dos tripomastigotas foram de  $0,5 \pm 0,18$  e  $0,3 \pm 0,19$  µg/ml, respectivamente. A morfologia dos parasitos tratados foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, revelando um inchaço nas mitocôndrias, formação de grandes projeções na membrana plasmática, completa alteração do corpo celular e aparente perda da organização das membranas das organelas. A citometria de fluxo, após 1 dia de tratamento com os respectivos DL<sub>50</sub>, mostrou uma marcação de 59% e 43% com iodeto de propídio e uma redução de 76 a 88% na marcação com Rhodamina123, em epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente. O efeito do veneno sobre células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas e tratadas, gerou uma significativa redução no número de amastigotas por célula infectada (76-93%) e por 100 células (94- 97,4%) após 96 horas de incubação com 37,5 ng/ ml. O veneno bruto foi então aplicado em uma coluna analítica de fase reversa C8 e parcialmente purificado por meio de sequenciais separações através da cromatografia líquida de alta resolução. De acordo com os perfis cromatográficos, as frações eluídas foram liofilizadas, ressuspensas em água, o conteúdo protéico mensurado pelo método de Bradford e a atividade avaliada sobre formas tripomastigotas. A pureza e a caracterização das frações oriundas das melhores separações foram avaliadas por SDS-PAGE e espectrometria de massas. Dentre as frações tripanocidas, isolamos e caracterizamos uma proteína pertencente à família das proteínas secretadas ricas em resíduos do aminoácido cisteína (CRiSP), até então não descrita no veneno de Cvv. Esta possui massa molecular de 24.893,64 Da e alta homologia à proteína catrina, com um DL<sub>50</sub>/24h de 0,93 µg/ ml sobre tripomastigotas. Nesta concentração, a proteína não apresentou toxicidade a músculos murinos isolados. Os resultados apresentados mostram que o veneno de Cvv possui algumas moléculas tripanocidas, onde uma proteína do tipo CRiSP pode ser uma potencial molécula para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da doença de Chagas.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, Quimioterapia, *Crotalus viridis viridis*, Microscopia eletrônica, Citometria de fluxo, RP-HPLC, Espectrometria de Massas, CRiSP.

Rio de Janeiro  
Julho de 2010

## ABSTRACT

Camila Marques Adade

### EVALUATION OF *Crotalus viridis viridis* SNAKE VENOM (CRUDE AND FRACTIONS) OVER MORPHOLOGY, PROLIFERATION AND INFECTIVNESS OF *Trypanosoma cruzi*

Orientadora: Thaís Souto-Padrón

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Animals' venoms are complex mixtures of different molecules with high therapeutic value. This thesis shows that *Crotalus viridis viridis* (Cvv) crude venom inhibit the epimastigotes proliferation, lysis trypomastigotes forms, besides acting in the *T. cruzi* intracellular cycle, at concentrations non toxic to host cells. This study also tried to identify the Cvv venom fractions involved in the trypanocidal effects. The Cvv crude venom treatment resulted in a reduction in the parasites number, where the LD<sub>50</sub> values of the inhibition of epimastigotes proliferation and trypomastigotes lysis were  $0.5 \pm 0.18$  and  $0.3 \pm 0.19$  µg/ml, respectively. The treated parasites morphology was analyzed by transmission and scanning microscopy, presenting mitochondria swelling, blebbing and disruption of plasma membrane, cell body alterations with apparent loss of organelle organization. After one day treatment with their respective LD<sub>50</sub>, flow cytometry analysis showed a 59% and 43% of propidium iodide and a 76 to 88% reduction of rhodamine123 staining confirming the alterations in plasma and mitochondrial membranes, of epimastigotes and trypomastigotes, respectively. Pre-infected LLC-MK<sub>2</sub> cells incubated with Cvv venom presented a 76-93% reduction in the parasites number/ infected cell and a 94-97.4% reduction per 100 cells after 96 h of infection. The crude venom extract was loaded onto to a reverse phase analytical (C8) column and partly purified by different chromatograms using a high performance liquid chromatographer. The obtained peaks were pooled in fractions according to the chromatograms profiles, lyophilized, resuspended in distillate water, their protein content measured by Bradford method, and biological activity determined over trypomastigotes forms. The purity and characterization of the fractions coming from the best segregation chromatographies was evaluated by SDS-PAGE and mass spectrometry. Among the trypanocidal fractions, we isolated and characterized a protein belonging to the cysteine-rich secretory protein (CRiSP) family, until then never described at the Cvv venom. This protein exhibited a molecular mass of 24,893.64 Da and the MS/MS-derived sequences are nearly identical to the protein Catrin and related snake venoms CRiSPs. Trypomastigotes treatment revealed a LD<sub>50</sub>/ 24h of 0.93 µg/ ml, and at this concentration no myotoxicity was observed in isolated murine gastrocnemius muscles. Our results showed that Cvv venom has some trypanocidal molecules among them a protein from the CRiSP family. This protein seems to be a promising component for an effective chemotherapy for the control of Chagas' disease.

**Key-Words:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease, chemotherapy, *Crotalus viridis viridis*, Electron Microscopy, Flow Cytometry, HPLC and Mass Spectrometry.

Rio de Janeiro  
Julho de 2010

## ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	01
1. Doença de Chagas.....	01
2. O protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	03
2.1. Taxonomia e ciclo de vida.....	03
2.2. Morfologia.....	05
2.3. Transmissão e controle.....	10
2.4. Tratamento.....	16
3. Produtos naturais.....	21
3.1. Serpentes e seus venenos.....	26
3.2. O veneno da <i>Crotalus viridis viridis</i> , nosso objeto de estudo.....	27
II. JUSTIFICATIVA.....	33
III. OBJETIVOS.....	34
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
1. Parasitos.....	36
2. Culturas de células.....	36
3. Veneno.....	36
4. Avaliação do efeito direto do veneno de Cvv e frações isoladas.....	36
4.1. Efeito direto do extrato total do veneno de Cvv sobre epimastigotas e tripomastigotas.....	36
4.2. Efeito direto das frações isoladas do veneno de Cvv sobre formas tripomastigotas durante o “screening” pós HPLC.....	37
4.3. Efeito direto da fração isolada do veneno de Cvv referente à proteína “catrina-like” sobre formas tripomastigotas.....	37
5. Efeito direto do veneno de Cvv previamente fervido no crescimento de formas epimastigotas.....	38
6. Avaliação do potencial citotóxico do veneno de Cvv sobre células LLC-MK <sub>2</sub> .....	38
7. Avaliação da atividade do veneno de Cvv sobre o ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i> em células hospedeiras.....	39
8. Avaliação da capacidade de infecção e progressão do ciclo intracelular de formas Tripomastigotas Diferenciados na presença de Veneno (TDVs).....	39
9. Determinação da atividade de PLA2 através do ensaio turbidimétrico adaptado de Marinetti (1965).....	40
10. Desafio das formas tripomastigotas pelo veneno de Cvv previamente inibido com pBPB.....	40
11. Análise das alterações morfológicas.....	41
11.1. Análise por microscopia eletrônica de varredura.....	41
11.2. Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	41
12. Análise por citometria de fluxo.....	42
13. Caracterização bioquímica do veneno de Cvv.....	42
13.1. Fracionamento por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em coluna analítica de fase reversa C8.....	42
13.2. Dosagem de proteína.....	43
13.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida do veneno de Cvv bruto e frações obtidas por RP-HPLC.....	43
13.4. Digestão tríptica <i>in gel</i> das bandas isoladas correspondes às frações purificadas.....	44
13.5. Espectrometria de massas.....	45
13.6. Análise dos peptídeos por bioinformática.....	46
13.7. Identificação das proteínas.....	46
14. Ensaio em camundongos.....	46
14.1. Animais.....	46

14.2. Avaliação da atividade miotóxica <i>in vitro</i> da proteína “catrina-like” .....	46
15. Análise estatística.....	47
V. RESULTADOS.....	48
1. Efeito direto do veneno bruto de Cvv.....	48
2. Efeito direto do veneno bruto de Cvv previamente fervido.....	49
3. Alterações morfológica geradas pelo veneno de Cvv em formas epimastigotas e tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> .....	50
4. Desafio de formas tripomastigotas pelo veneno de Cvv previamente inibido com p-bromofenacil brometo ( <i>p</i> BPB).....	55
5. Avaliação citotóxica do veneno bruto de Cvv sobre células LLC-MK <sub>2</sub> .....	57
6. Avaliação da atividade do veneno bruto de Cvv sobre células LLC-MK <sub>2</sub> infectadas com <i>T. cruzi</i> .....	59
7. Caracterização bioquímica do veneno de Cvv.....	63
8. Atividade biológica da proteína “catrina-like” sobre formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> e sobre células musculares isoladas de camundongos.....	73
VI. DISCUSSÃO.....	82
VII. CONCLUSÕES.....	89
1. O veneno bruto de Cvv é tóxico ao <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	89
2. Nas concentrações utilizadas, o veneno de Cvv não é tóxico para células LLC-MK <sub>2</sub> .....	89
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
IX. ANEXOS.....	127
1. ANEXO 1.....	122
2. ANEXO 2.....	135
3. ANEXO 3.....	151

## LISTA DE ABREVIATURAS

- SIDA:** síndrome da imunodeficiência adquirida
- ATP:** adenosina trifosfato
- BIP:** peptídeo inibidor de bradicinina (**bradykinin inhibitory peptide**)
- BPP:** peptídeo potenciador de bradicinina (**bradykinin-potentiating peptide**)
- CAUAP:** Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa
- CaCl<sub>2</sub>:** cloreto de cálcio
- CK:** creatino kinase
- CRiSP:** proteína secretada rica em resíduos cisteína (**cysteine rich protein**)
- Cvv:** *Crotalus viridis viridis*
- DL<sub>50</sub>:** dose letal que mata 50% dos parasitos
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- DPPV IV:** dipeptidil peptidase IV
- DTT:** ditioneitol
- EDL:** *Extensor digitorum longus*
- ELISA:** “Enzyme Linked imunoassay”- Ensaio enzimático de imunoaderência ligado à enzima
- ESI:** Ionização por “Eletrospray”
- FACS:** sistema automatizado de citometria de fluxo
- GA:** glutaraldeído
- GPI:** glicosilfosfatidilinositol
- GTP:** guanosina trifosfato
- HCl:** Ácido clorídrico
- HIV:** vírus da imunodeficiência humana
- RP-HPLC:** Cromatografia líquida de alta resolução no modo fase reversa
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio
- KCl:** cloreto de potássio
- kDa:** Quilodaltons
- kDNA:** DNA do cinetoplasto
- LAFEPE:** Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
- LC-MS/MS:** cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem
- MALDI:** “Matrix Assisted Laser Dessorption Ionization” ionização a laser

assistida por matriz

**MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**NaCl:** Cloreto de sódio

**NAD:** dinucleótido de nicotinamida-adenina (**nicotinamide adenine dinucleotide**)

**NaHCO<sub>3</sub>:** bicarbonato de sódio

**NaHPO<sub>4</sub>:** fosfato de sódio

**NCBI:** Centro de Informação Nacional para Biotecnologia

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**OPAS:** Organização Panamericana de Saúde

**OsO<sub>4</sub>:** tetróxido de ósmio

**p-BPB:** *para*-bromo-fenacil-brometo

**PBS:** solução salina tamponada com fosfato (**phosphate buffered saline**)

**PCR:** reação em cadeia da polimerase (**polimerase chain reaction**)

**PFA:** paraformaldeído

**pI:** ponto isoelétrico

**PLA<sub>2</sub>:** fosfolipase A<sub>2</sub>

**PSS:** solução de Ringer fisiológica (**physiological saline solution**)

**IAA:** Iodoacetamida

**IP:** iodeto de propídio

**Q-TOF:** analisadores associados (tandem) do tipo quadrupolo e tempo de voo

**Rh123:** rodamina 123

**RNA:** ácido ribonucléico

**RPMI:** acrónimo de **Roswell Park Memorial Institute**

**SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS)

**SFB:** Soro Fetal Bovino

**TFA:** ácido trifluoracético

**TOF:** Analisador do tipo tempo de voo

**vWF:** fator von Willebrand

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Prancha original do artigo de Carlos Chagas descrevendo o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	01
<b>Figura 2:</b> O "sinal de Romaña" indica a fase aguda da infecção chagásica.....	02
<b>Figura 3:</b> Algumas espécies de triatomíneos vetores da doença de Chagas.....	04
<b>Figura 4:</b> Ciclo da infecção pela Doença de Chagas.....	05
<b>Figura 5:</b> Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	06
<b>Figura 6:</b> Esquema geral da morfologia da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	08
<b>Figura 7:</b> Habitantes de moradia típica das regiões rurais, conhecida como "cafú".....	13
<b>Figura 8:</b> Fluxo de imigrantes provenientes de países endêmicos para o <i>T. cruzi</i> .....	15
<b>Figura 9:</b> Fórmulas dos dois nitroderivados utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	17
<b>Figura 10:</b> <i>Crotalus viridis viridis</i> (Cvv) popularmente conhecida como "cascavel".....	28
<b>Figura 11:</b> Gel de SDS-PAGE mostrando a complexa composição dos venenos de algumas <i>Crotalus</i> sp.....	32
<b>Figura 12:</b> Efeito do veneno de Cvv previamente fervido sobre a proliferação de epimastigotas do <i>T. cruzi</i> .....	50
<b>Figura 13:</b> Efeito do veneno de Cvv sobre a ultraestrutura de epimastigotas do <i>T. cruzi</i> .....	53
<b>Figura 14:</b> Efeito do veneno de Cvv sobre a ultraestrutura de tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> .....	54
<b>Figura 15:</b> Atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> no veneno bruto de Cvv e sua inibição pelo <i>para</i> -Bromo-Fenacil Brometo ( <i>p</i> BPB).....	56
<b>Figura 16:</b> Avaliação da toxicidade do veneno bruto de Cvv sobre células LLC-MK <sub>2</sub> .....	58
<b>Figura 17:</b> Células LLC-MK <sub>2</sub> infectadas e tratadas com o veneno de Cvv.....	60
<b>Figura 18:</b> Ultraestrutura dos TDVs.....	62
<b>Figura 19:</b> 1ª corrida cromatográfica do veneno de Cvv em coluna C8 por RP-HPLC.....	63
<b>Figura 20:</b> Atividade de lise das frações 2-5 obtidas a partir da primeira corrida cromatográfica.....	64

<b>Figura 21:</b> Cromatograma referente ao segundo fracionamento do veneno de Cvv por HPLC.....	65
<b>Figura 22:</b> Atividade de lise das frações 2 e 3 obtidas após o segundo fracionamento do veneno de Cvv.....	65
<b>Figura 23:</b> Cromatograma referente ao terceiro fracionamento do veneno de Cvv.....	66
<b>Figura 24:</b> Porcentual de lise apresentada pelas 8 frações que exibiram atividade tripanocida após 24 h de tratamento nas concentrações de 0,6 a 4,8 µg/ml.....	67
<b>Figura 25:</b> SDS-PAGE das oito frações que exibiram atividade tripanocida.....	68
<b>Figura 26:</b> Gráfico gerado pelo programa MASCOT e análise das sequências da proteína de Cvv isolada na presença de β-mercaptoetanol.....	70
<b>Figura 27:</b> Gráfico gerado pelo programa MASCOT e análise das sequências da proteína de Cvv isolada na ausência de β-mercaptoetanol.....	70
<b>Figura 28:</b> Etapas seqüenciais de HPLC e MALDI para a purificação e isolamento da proteína catrina-like.....	72
<b>Figura 29:</b> Gráfico gerado pelo programa MASCOT e análise das sequências mostrando uma cobertura de 23% de peptídeos idênticos.....	73
<b>Figura 30:</b> Atividade de lise da fração referente a proteína purificada “catrina-like” do veneno de Cvv após as etapas de purificação.....	74
<b>Figura 31:</b> Formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> não tratadas com a proteína “catrina-like”.....	76
<b>Figura 32:</b> Tripomastigotas tratados por 1h com 0,93 µg/ml da proteína “catrina-like”.....	77
<b>Figura 33:</b> Tripomastigotas tratados por 2h com 0,93 µg/ml da proteína “catrina-like”.....	78
<b>Figura 34:</b> Tripomastigotas tratados por 24h com 0,93 µg/ml da proteína “catrina-like”.....	79
<b>Figura 35:</b> Principais alterações detectadas no cinetoplasto de tripomastigotas tratados com 0,93 µg/ml da proteína catrina-like, nos diferentes tempos.....	80
<b>Figura 36:</b> Atividade miotóxica da catrina-like (0,93 µg/mL) em músculos EDL isolados de camundongos.....	81

## LISTA DE TABELAS

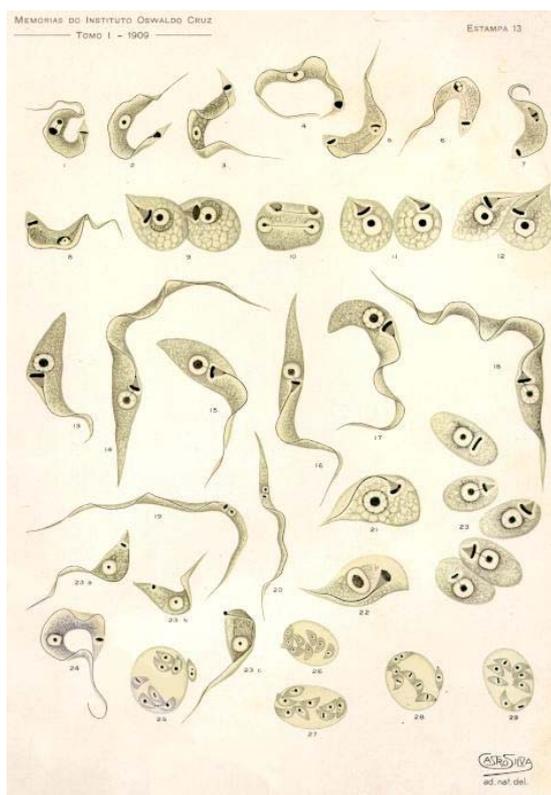
<b>Tabela 1:</b> Algumas toxinas utilizadas como ferramentas diagnósticas.....	23
<b>Tabela 2:</b> Drogas baseadas em toxinas aprovadas pela U. S. Food and Drug Administration (FDA).....	24
<b>Tabela 3:</b> Drogas baseadas em toxinas aprovadas para triagens clínicas nos EUA.....	25
<b>Tabela 4:</b> Resumo dos componentes já identificados no veneno de Cvv.....	29
<b>Tabela 5:</b> Diferentes valores de DL <sub>50</sub> obtidos pelos tratamentos das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i> com o veneno bruto de Cvv.....	48
<b>Tabela 6.</b> Análise por citometria de fluxo do <i>T. cruzi</i> tratado com veneno de Cvv e marcados com IP e Rh 123.....	52
...	
<b>Tabela 7.</b> Evolução da proliferação de amastigotas intracelulares derivados da infecção de células LLC-MK <sub>2</sub> por TDVs.....	61
<b>Tabela 8:</b> Análise de similaridade da sequência peptídica primária gerada por MS/MS (Q-tof) gerada a partir da amostra isolada na ausência de agente redutor.....	71

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e foi descoberta por Carlos Chagas (1909), que caracterizou diversos aspectos da patogenia e sintomatologia da doença, incluindo o parasito, o seu vetor e o ciclo biológico (Fig. 1).

A enfermidade é autóctone em 22 países do hemisfério ocidental e os últimos dados epidemiológicos estimam que cerca de 16 a 18 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com este parasito, sendo 5 milhões apenas no Brasil (PINTO DIAS & COURA, 1997; WHO, 1991, 1998, 2002). Os únicos países de língua espanhola nas Américas que não apresentam humanos infectados pelo *T. cruzi* são Cuba e República Dominicana (WHO, 1991). Em países endêmicos, estima-se que a doença de Chagas tenha causado 45 mil mortes por ano na década de 80, 23 mil na década de 90 e 11 mil a partir de 2000 (revisto em SCHMUNIS, 2007).



**Figura 1.** Prancha original do artigo de Carlos Chagas descrevendo o *Trypanosoma cruzi*. A legenda original da figura é:

Preparados do *Schizotrypanum cruzi*. Fixação a humido pelo sublimado-alcool (SCHAUDINN).

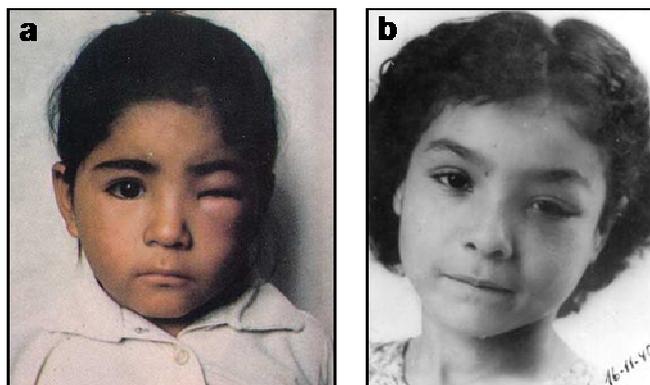
Coloração pela hematoxilina ferrea (ROSENBUSCH).

Obtido do sítio: Biblioteca virtual Carlos Chagas:

<http://www.prossiga.br/chagas/>

No homem o período de incubação, por infecção vetorial, varia de 7 a 10 dias quando se inicia a fase aguda da doença, geralmente oligossintomática, despercebida com freqüência, e reconhecida em apenas 1-2% dos casos, em regiões não

endêmicas. Esta fase é relacionada a uma alta parasitemia e à presença de infiltrados inflamatórios em diferentes tecidos (revisto em LOPES & CHAPADEIRO, 1997). Em crianças menores de dois anos, que não recebem tratamento, a letalidade nesta fase pode chegar a 10%. O local da entrada do parasito é geralmente marcado por uma lesão de pele, denominada chagoma de inoculação. No caso da contaminação pela conjuntiva ocular, a lesão caracteriza-se por conjuntivite e edema bupalpebral unilateral, impedindo a abertura do olho correspondente, denominada sinal de Romaña (DIAS, 1934) (**Fig. 2**).



**Figura 2:** a: O "sinal de Romaña" indica a fase aguda da infecção chagásica; b: Maria Albina da Silva, primeiro caso agudo da doença de Chagas identificado na cidade mineira de Bambuí. Localização do Documento: Fundação Oswaldo Cruz - Casa de Oswaldo Cruz – DAD

Após a fase aguda, a maior parte dos indivíduos infectados evolui para a forma indeterminada (latente) da fase crônica, caracterizada por positividade dos exames sorológicos e/ou parasitológicos, ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma normal ou com alterações menores, coração, esôfago e cólon radiologicamente normais (MACÊDO, 1997; RIBEIRO & ROCHA, 1998). A maioria dos indivíduos com infecção crônica permanece na forma indeterminada por toda a vida, porém cerca de 36% evolui para a fase crônica sintomática, depois de até 30 anos da infecção (revisto em RASSI, 1982; ANDRADE, 1985; WHO, 1997). Calcula-se que pacientes que desenvolvem a sintomatologia crônica apresentam redução de cerca de nove anos na expectativa de vida. (PUNUKOLLU *et al.*, 2007).

Estudos com crianças chagásicas com a forma indeterminada mostraram que o tratamento com as drogas disponíveis apresenta relativa ineficiência, uma vez que 33,3% dos casos evoluíram para a fase crônica sintomática (SILVEIRA, CASTILLO & CASTRO, 2000). Dentre os pacientes na fase crônica sintomática, cerca de 27%

desenvolvem dano cardíaco progressivo, com insuficiência cardíaca, distúrbios cardíacos de ritmo e condução, aumento do coração, ocorrendo freqüentemente morte súbita. São relatados ainda casos de pacientes com comprometimento digestivo (6%), onde alterações da secreção, motilidade, absorção e, nos casos mais graves, megavísceras (cólon e esôfago) são os sintomas característicos (KÖBERLE, 1956; REZENDE, 1984). Aproximadamente 3% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam lesões neurológicas periféricas (WHO, 1997).

A reativação da doença de Chagas pode levar ao aparecimento de formas graves associadas a manifestações cardíacas, nervosas e lesões cutâneas, e é gerada em situações de imunossupressão, como em transplantes (PIZZI *et al.*, 1982; LEIGUARDA *et al.*, 1990; LA FORGIA *et al.*, 2003; ATCLAS *et al.*, 1999, 2005; BARCÁN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010), leucemias (MONTEVERDE *et al.*, 1976; CORONA *et al.*, 1988) e SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (ODDÓ *et al.*, 1992; ROSEMBERG *et al.*, 1992; NISHIOKA *et al.*, 1993; SARTORI *et al.*, 1995, 1998, 1999). Também há relatos de dois pacientes HIV (vírus da imunodeficiência humana) -positivos que reativaram a doença de Chagas na sua forma assintomática, caracterizada por xenodiagnóstico (GALHARDO *et al.*, 1999) ou parasitemia (SARTORI *et al.*, 2002). A reativação de doença de pacientes HIV-positivos também pode ser acompanhada de manifestações clínicas não usuais, incluindo no sistema nervoso central (DIAZGRANADOS *et al.*, 2009).

## **2. O protozoário *Trypanosoma cruzi***

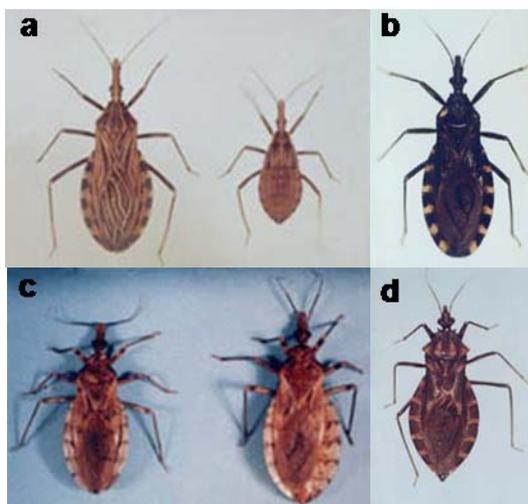
### *2.1. Taxonomia e ciclo de vida*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado parasito que apresenta um ciclo de vida heteroxênico, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado (inseto triatomíneo hematófago) e um vertebrado (mamíferos, incluindo o homem).

Segundo a nomenclatura taxonômica tradicional (LEVINE *et al.*, 1980), este protozoário pertence ao filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Entretanto, em uma classificação mais recente dos cinetoplastídeos utilizando seqüências gênicas de RNAr 18S amplificadas de DNA ambiental (CAVALIER-SMITH, 1998; MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA & VICKERMAN, 2004), foram propostas mudanças significativas na taxonomia destes protozoários. Foi sugerida a seguinte classificação: Império Eucariota, reino Protozoa, sub-Reino Neozoa, infra-Reino Discicristata, filo Euglenozoa,

classe Kinetoplastea, sub-classe Metakinetoplastina, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae.

O vetor do *T. cruzi* é um inseto hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, sub-família Triatominae, popularmente conhecido como barbeiro. Os triatomíneos pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (**Fig. 3**) são os mais importantes do ponto de vista da transmissão da doença de Chagas, embora mais de 120 espécies estejam envolvidas na transmissão do *T. cruzi* (LENT & WYGODZINKY, 1979).



**Figura 3.** Algumas espécies de triatomíneos vetores da doença de Chagas. *Obtido do sítio da:* Superintendência de Controles de Endemias (SUCEN).

<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>. a: *Rhodnius neglectus*; b: *Triatoma infestans*; c: *Triatoma sordida*; d: *Panstrongylus megistus*

Quando no lúmen do intestino do inseto vetor, o *T. cruzi* prolifera sob a forma epimastigota, não infectiva ao hospedeiro vertebrado (**Fig. 4**). Estas formas colonizam o tubo digestivo do inseto e ao atingirem a ampola retal (porção final do intestino) se diferenciam em formas infectivas denominadas tripomastigotas metacíclicos, formas não proliferativas que são eliminadas juntamente com as fezes e urina do inseto durante o repasto sanguíneo em um mamífero (BRACK, 1968; BRENER & ALVARENGA, 1976). Tripomastigotas metacíclicos, ao infectarem o hospedeiro vertebrado, podem também invadir macrófagos e células localizadas no sítio de inoculação. No interior da célula hospedeira, as formas tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo e livres no citoplasma se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Após passarem por alguns ciclos reprodutivos, as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas (DVORAK & HYDE,

1973), que rompem a membrana plasmática da célula hospedeira e sendo então liberados, podendo assim invadir células vizinhas ou infectar outros tecidos, caso sejam transportados pelas correntes sanguínea e linfática. A ingestão de sangue infectado por insetos vetores permitirá a diferenciação das formas tripomastigotas em epimastigotas no lúmen do tubo digestivo, completando assim o ciclo de vida do parasito (revisto em MORTARA *et al.*, 2005; ANDRADE & ANDREWS, 2005).

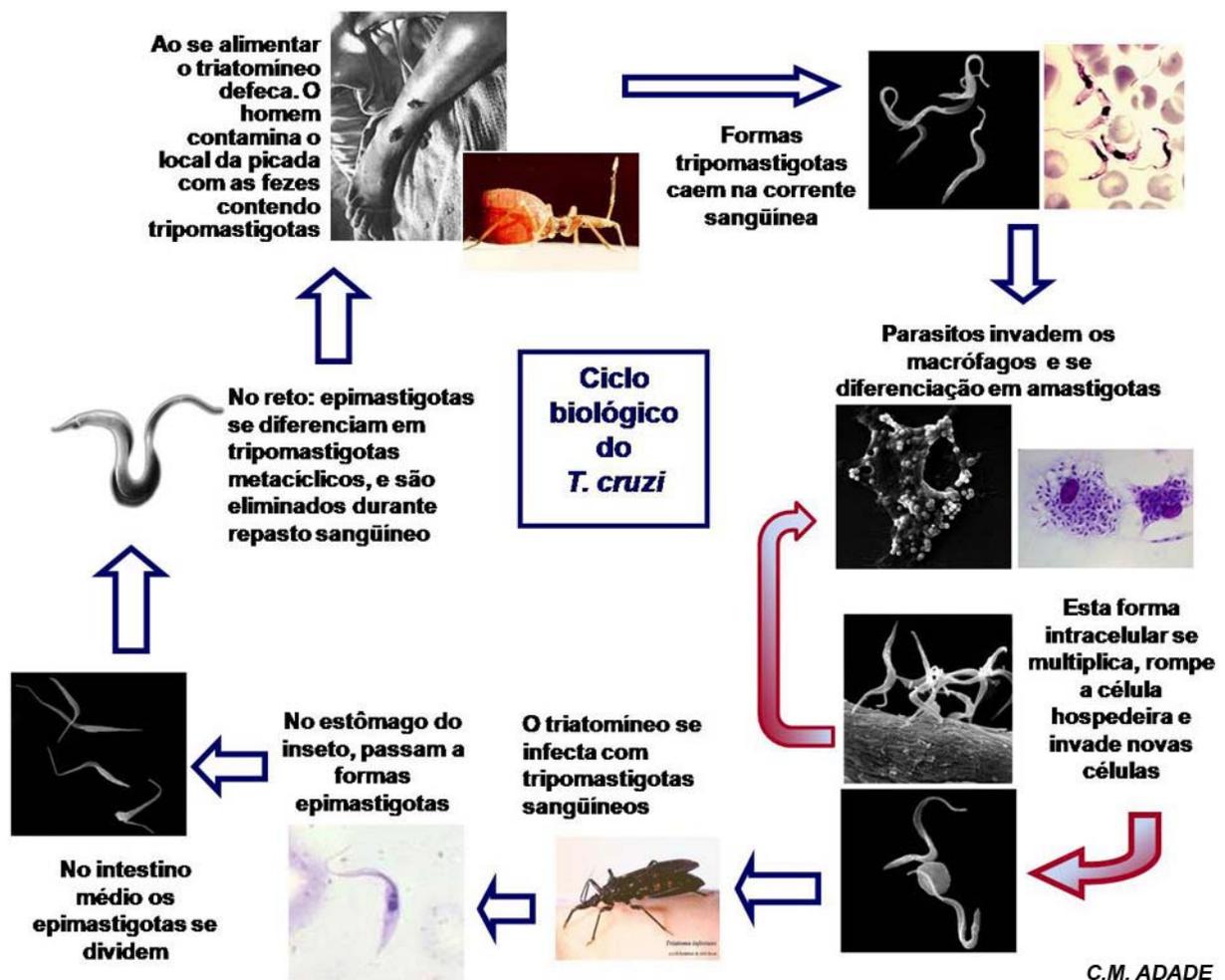
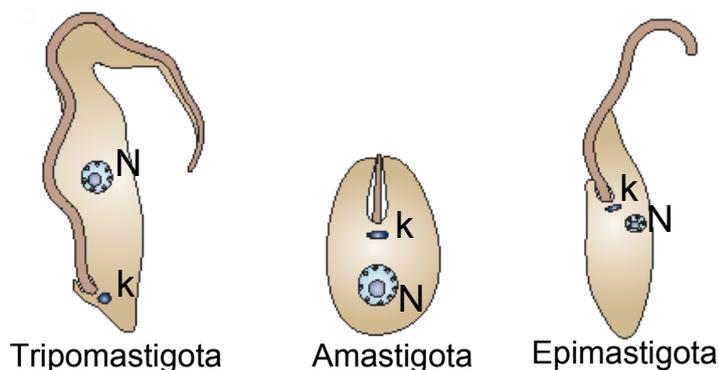


Figura 4. Ciclo da infecção pela Doença de Chagas. Figura de C. M. Adade.

Foi descrito em glândulas de cheiro de gambás *Didelphis marsupialis* um ciclo normalmente encontrado no inseto vetor, paralelo ao intracelular dos vertebrados. Neste ciclo há formas epimastigotas multiplicativas extracelulares e formas tripomastigotas metacíclicas, sugerindo que o parasitismo desta glândula seja uma aquisição secundária do ciclo biológico do parasito, que poderia levar à independência do inseto vetor (DEANE, LENZI & JANSEN, 1984; JANSEN *et al.*, 1997).

## 2.2. Morfologia

O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (**Fig. 5**), as quais são distintas morfologicamente, tanto pela forma do corpo, quanto pela localização do cinetoplasto, uma porção da mitocôndria onde se concentra DNA mitocondrial (conhecido como k-DNA) que se marca fortemente em preparações coradas para observação por microscopia de luz (revisto em DE SOUZA, 1980, 1984, 2002).



**Figura 5.** Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Modificado de DOCAMPO *et al.*, 2005. N: núcleo; k: cinetoplasto

Nas formas tripomastigotas, o flagelo emerge da região posterior do corpo e se dirige para a região anterior, aderido à membrana plasmática. O flagelo é responsável pelo deslocamento do parasito e desta maneira, o movimento ondulatório do flagelo é transmitido à membrana plasmática do protozoário, formando-se assim uma estrutura semelhante à “membrana ondulante”. As formas amastigotas são arredondadas, sem flagelo aparente e com um cinetoplasto em forma de barra. Em formas epimastigotas o flagelo emerge lateralmente na porção anterior do corpo, com o cinetoplasto anterior ao núcleo e em forma de barra.

O *T. cruzi* possui, assim como os outros tripanosomatídeos, além das organelas típicas de células eucarióticas, outras que lhe são características, tais como cinetoplasto, citóstoma, acidocalcisomos e reservosomos (revisto em DE SOUZA, 1980, 1984, 2002).

A membrana plasmática apresenta a estrutura tradicional constituída por uma bicamada lipídica, proteínas e carboidratos distribuídos na face externa, formando o glicocálice por toda a superfície celular (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALEZ-ROBBLES, 1978). Presentes na membrana há três macrodomínios: a porção de membrana que recobre o corpo celular, a que recobre o flagelo e a que recobre a bolsa flagelar. Estes macrodomínios podem ser distinguidos entre si pela

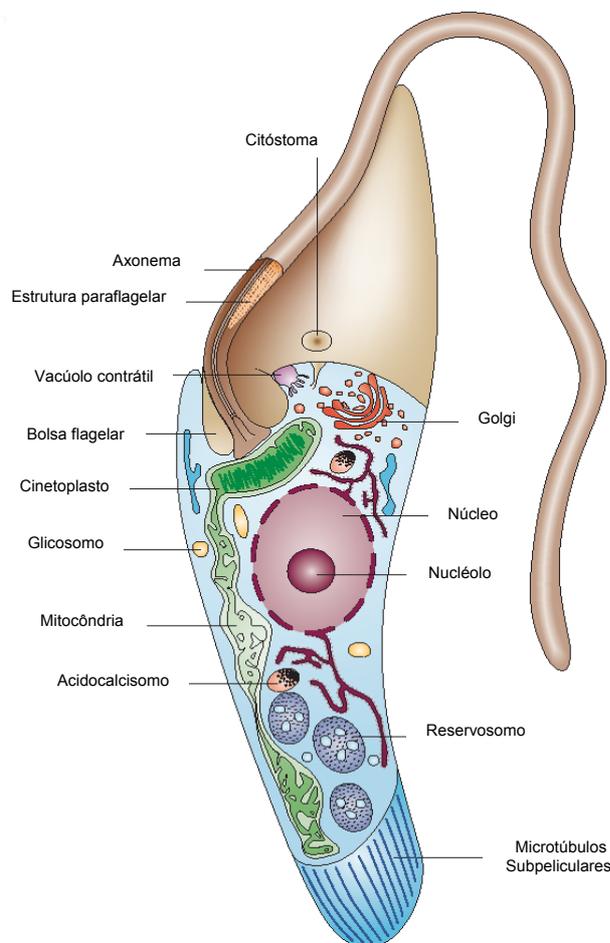
presença de microtúbulos sub-peliculares, apenas associados à membrana que recobre o corpo celular, e pelos microtúbulos do axonema, que estão associados apenas à membrana do flagelo (revisto em DE SOUZA, 2007). Os microtúbulos sub-peliculares se localizam imediatamente abaixo da membrana (**Fig. 6**), distribuídos longitudinalmente, e estão conectados uns aos outros e à membrana plasmática por proteínas filamentosas, conferindo assim rigidez à célula (MEYER & DE SOUZA, 1976; DE SOUZA, 1989; DE SOUZA & SOUTO-PADRÓN, 1984; revisto em DE SOUZA, 1999, 2002).

O núcleo, que é arredondado nas formas amastigotas e epimastigotas, e alongado nas formas tripomastigotas, apresenta nucléolo central e cromatina periférica. Durante o processo mitótico, a membrana nuclear permanece intacta e desaparecem a cromatina e o nucléolo (endomitose). Os cromossomos são de difícil visualização, uma vez que não se condensam em nenhuma das formas evolutivas do parasito (revisto em DE SOUZA, 2002).

Como comentado anteriormente, a movimentação do parasito é feita por meio de um flagelo, também de fundamental importância à adesão a diferentes substratos, como por exemplo, à parede do tubo digestivo do inseto. O flagelo tem origem em um corpúsculo basal localizado próximo ao cinetoplasto, apresentando um arranjo clássico de microtúbulos tipo “9+2”, além de uma estrutura paraxial formada por uma rede de filamentos. O flagelo exterioriza-se do corpo por intermédio de uma invaginação da membrana plasmática denominada bolsa flagelar (**Fig. 6**), através da qual o parasito secreta macromoléculas e internaliza nutrientes do meio externo. Um segmento significativo do flagelo é fortemente aderido ao corpo celular por uma região designada zona de adesão flagelar (FAZ), que apresenta um agrupamento de proteínas integrais distribuídas em intervalos relativamente regulares, e onde uma glicoproteína de membrana de 72 kDa (Gp72) é imunodominante (MARTINEZ-PALOMO, DE SOUZA & GONZALEZ-ROBLES, 1976; KOHL & GULL, 1998; RUIZ-MORENO *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 2006). Em tripanosomatídeos, o flagelo pode funcionar tanto como uma hélice, impulsionando o parasito para a região anterior, como ao contrário como o que ocorre em outras células dotadas do mesmo, como os espermatozóides.

A mitocôndria do *T. cruzi* é única e ramifica-se pelo corpo do protozoário (PAULIN, 1975) (**Fig. 6**), apresentando diversas enzimas comuns às presentes em outras células eucarióticas (MEIRELLES & DE SOUZA, 1980). Em sua região próxima ao corpúsculo basal, observa-se uma região com alta concentração de DNA extranuclear, o cinetoplasto (BORST & HOEIJMAKERS, 1979). O DNA desta organela (kDNA) pode representar de 20% a 30% do DNA total da célula, composto por milhares de mini-círculos e dezenas de maxi-círculos associados (SHAPIRO &

ENGLUND, 1995). RNAs ribossomais e algumas proteínas mitocondriais são codificadas pelas dúzias de cópias de maxi-círculos, enquanto que os milhares de cópias dos mini-círculos são responsáveis pela produção de pequenas moléculas de RNA, que irão editar as moléculas de RNA mensageiro dos transcritos mitocondriais (JUNQUEIRA, DEGRAVE & BRANDÃO, 2005; revisto em LIU *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Esquema geral da morfologia da forma epimastigota de *T. cruzi*. Detalhe para os reservosomos, organelas ausentes nas demais formas morfológicas desse parasito. Modificado de DOCAMPO *et al.*, 2005.

Perfis de retículo endoplasmático encontram-se distribuídos por todo o citoplasma da célula, inclusive na periferia. O complexo de Golgi, formado por poucas cisternas empilhadas, está localizado na porção anterior do corpo nas formas epimastigota e amastigota e na região posterior nas formas tripomastigotas, sempre próximo à bolsa flagelar (revisto em DE SOUZA, 2002).

O *T. cruzi* também apresenta organelas ácidas (**Fig. 6**) como reservosomos, encontrados apenas em epimastigotas (SOARES & DE SOUZA, 1988; revisto em

SOARES, 1999; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; SANT'ANNA, DE SOUZA & CUNHA-E-SILVA, 2004), acidocalcisomos, presentes em todas as formas do parasito (DVORAK *et al.*, 1988; DOCAMPO *et al.*, 1995; revisto em DOCAMPO *et al.*, 2005), e organelas relacionadas a lisosomos (LROs), que além dos reservosomos de epimastigotas, são pequenas organelas presentes nas formas tripomastigotas e amastigotas e que apresentam características semelhantes aos lisosomos de células mamíferas (SANT'ANNA *et al.*, 2008; revisto em DE SOUZA, SANT'ANNA & CUNHA-E-SILVA, 2009).

Os processos de endocitose ocorrem por ingestão de macromoléculas através da bolsa flagelar e do citóstoma. O citóstoma é uma invaginação da membrana plasmática próxima à bolsa, e está presente nas formas epimastigota e amastigota, e ausente em formas tripomastigotas (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALEZ-ROBBLES, 1978; SOARES & DE SOUZA, 1988, 1991; revisto em DE SOUZA, 2002). Ele se continua com a formação da citofaringe, onde na sua porção final, há o brotamento de vesículas endocíticas pela qual ocorre a internalização de nutrientes, com subsequente armazenamento e processamento nos reservosomos (SOARES & DE SOUZA, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; SANT'ANNA, DE SOUZA & CUNHA-E-SILVA, 2004).

Os reservosomos são estruturas esféricas delimitadas por uma unidade de membrana, com diâmetro de 0,4 a 0,6  $\mu\text{m}$ . Estas organelas se localizam preferencialmente na porção posterior do parasito, apresentando uma matriz protéica e elétron-densa onde estão imersas inclusões lipídicas (SOARES & DE SOUZA, 1988). Apresentam pH em torno de 6,0, e são considerados como compartimentos pré-lisosomais por acumularem proteínas e lipídios ingeridos e por serem ricos em cisteíno-proteinase, apesar de não apresentarem fosfatase ácida e de não se marcarem positivamente com anticorpos anti-proteínas de células de mamíferos associadas às membranas lisosomais, como LAMP1, LAMP2 e Igp120 (SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992). Os reservosomos contêm cruzipaina, principal cisteíno proteinase do *T. cruzi* (CAZZULO, STOKA & TURK, 1997; revisto em SOARES, 1999), e aparentam desempenhar um papel crucial no processo de diferenciação celular do parasito (metaciclogênese), uma vez que seu conteúdo é consumido ao longo deste processo, resultando no desaparecimento da organela em formas tripomastigotas. O consumo de seu conteúdo também ocorre quando o parasito é submetido a um estresse nutricional (SOARES *et al.*, 1989; FIGUEIREDO, STEINDEL & SOARES, 1994; revisto em SOARES, 1999). Experimentos de metaciclogênese reversa mostraram que a biogênese dos reservosomos se inicia durante a diferenciação de formas tripomastigotas/amastigotas em epimastigotas, com

a formação de vesículas elétron-densas a partir do complexo de Golgi contendo cisteíno-proteinases e outras hidrolases (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). Estas vesículas se movem da região do complexo de Golgi para a região posterior das formas epimastigotas diferenciadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2004; SANT'ANNA, DE SOUZA & CUNHA-E-SILVA, 2004).

Acidocalcisomos são pequenas organelas esféricas, delimitadas por uma unidade de membrana e geralmente distribuídas por todo o corpo do parasito. Estas organelas apresentam alta elétron-densidade, contêm grande parte do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  em tripanosomatídeos e outros protozoários patogênicos, incluindo *Trypanosoma brucei*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Plasmodium berghei* e *Toxoplasma gondii* (DOCAMPO *et al.*, 1995; SCOTT, MORENO & DOCAMPO, 1995; SCOTT *et al.*, 1998; MIRANDA *et al.*, 2000; MARCHESINI *et al.*, 2000; MCINTOSH & VAIDYA, 2002; revisto em DOCAMPO *et al.*, 2005). Microanálise de raios-X permitiu demonstrar que o lúmen do acidocalcisomo contém grandes quantidades de fósforo, magnésio, potássio, sódio, zinco e ferro (SCOTT *et al.*, 1997; CORRÊA, ANDRADE, & SOARES, 2002). O fósforo está presente sob a forma de polifosfatos de cadeia curta ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) e pirofosfato inorgânico (PPi), sendo este mais abundante que o ATP (URBINA, 1999). O pH ácido é mantido pela ação de  $\text{H}^+$ -ATPases e por  $\text{H}^+$ -PPases do tipo vacuolar. Uma  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ -ATPase translocadora é responsável pela incorporação e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  (revisto em DOCAMPO *et al.*, 2005).

Glicosomos são organelas típicas de tripanosomatídeos e são semelhantes aos peroxisomos das demais células eucarióticas. Podem ter formato arredondado ou alongado, matriz densa e homogênea, e estão presentes em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*. Foram encontradas moléculas envolvidas no metabolismo do peróxido (como a catalase) em tripanosomatídeos monoxênicos (WERTLIEB & GUTTMAN, 1963; GUTTERIDGE *et al.*, 1982), mas esta enzima ainda não foi detectada nos glicosomos do *T. cruzi*. Nestas organelas foram encontradas enzimas que participam da oxidação de aminoácidos e lipídeos, e parte da via metabólica da glicólise (revisto em DE SOUZA, 2002; HANNAERT *et al.*, 2003; PARSONS, 2004). WILKINSON e cols. (2005) demonstraram que estas organelas também têm papel fundamental na síntese de vitamina C em *T. cruzi* e *T. brucei*, por meio da enzima arabinonolactona oxidase (ALO), que produz eritroascorbato a partir da D-arabinono- $\gamma$ -lactona.

### 2.3. Transmissão e controle

A doença de Chagas pode ser transmitida por diversas vias (revisto em MOYA & MORETTI, 1997; MONCAYO & SILVEIRA, 2009), sendo a vetorial (80-90%), a transfusional (8-18%) e a congênita (2-3%), as principais. Outras formas de transmissão incluem aquelas causadas por acidentes em laboratório (revisto em PINTO DIAS, 1990; KINOSHITA-YANAGA *et al.*, 2009), por transplantes de órgãos (revisto em BARSOUM, 2004) e por via oral (revisto em CAMANDARROBA, PINHEIRO LIMA & ANDRADE, 2002; DIAS, 2006b), sendo que esta última pode estar relacionada à ingestão de alimentos crus ou mal cozidos contaminados com urina e/ou fezes de gambás (*Didelphis marsupialis*) e/ou de vetores infectados (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; GUS, MOLON & BUENO, 1993).

A transmissão por via oral pode ter tido um antecedente experimental desde o início dos estudos sobre a doença quando a pedido de Carlos Chagas, Oswaldo Cruz colocou triatomíneos infectados e sagüis juntos em uma jaula tornando os macacos infectados (CHAGAS, 1909). Neste relato, foi mencionado que não teria ocorrido inoculação, ausência de sinais de porta de entrada e a sugestão de que os saguis haviam ingerido os insetos. A partir deste, diversos experimentos comprovaram a possibilidade da transmissão oral por ingestão de carne com ninhos de amastigotas, sucos e alimentos crus contaminados com as formas tripomastigotas e também pela ingestão de insetos triatomíneos e/ ou outros insetos, como moscas, infectados (MAZZA *et al.*, 1936; DIAZ-UNGRÍA, 1969, DIAZ-UNGRÍA & BRACHO, 1970; DIAZ-UNGRÍA & ZEUSS, 1971; ROELLING, revisto em DIAS, 2006b; ELLIS & YABSLEY, 2009;).

Até o ano de 2001, 148 casos de infecção oral foram relatados em toda a Amazônia brasileira (principalmente Pará, Amazonas, Acre, Amapá, Maranhão e Rondônia), sendo 121 considerados agudos com 5 óbitos registrados. Em 1965 (Teutônia, RS) e 1986 (Catolé do Rocha, PB) foram registrados 17 e 26 casos, respectivamente, de contaminação oral por *T. cruzi*. No Rio Grande do Sul ocorreu por ingestão de alimentos, e na Paraíba por ingestão de caldo-de-cana (revisto em LEWINSOHN, 2005a, 2005b, 2005c). Em 2005, duas micro-epidemias ocorreram no Brasil, sendo uma no Amapá e a outra, de grande divulgação na imprensa nacional, em Santa Catarina. No Amapá, o Serviço de Epidemiologia da Secretaria Estadual de Saúde relatou a infecção de 26 moradores da região de Igarapé da Fortaleza pela ingestão de suco de açaí contaminado. Em Santa Catarina, a Vigilância Epidemiológica confirmou 31 casos do surto e 136 suspeitos, além de 6 óbitos em indivíduos que adquiriram a doença de Chagas pela ingestão de caldo de cana, próximo à cidade de Navegantes (revisto em LEWINSOHN, 2005a, 2005b, 2005c; STEINDEL *et al.*, 2008). A gravidade do episódio de Santa Catarina foi relacionada à

alta carga parasitária nos indivíduos infectados, muito superior àquela observada durante uma transmissão vetorial. Os casos de infecção por ingestão de suco do açaí e caldo de cana podem ter ocorrido devido à contaminação dos sucos por fezes ou urina do barbeiro, ou pela moagem de insetos infectados juntamente com a cana e as frutas processadas (revisto em LEWINSOHN, 2005a, 2005b, 2005c; STEINDEL *et al.*, 2008).

Durante os meses de Janeiro a Novembro de 2006, um total de 178 casos da forma aguda da doença de Chagas foi relatado somente no estado do Pará. Dos indivíduos da cidade de Barcarena, a maior parte dos pacientes se tornou infectada pela ingestão de açaí não pasteurizado. Outros relatos da origem da infecção por estes indivíduos foram o charque, frutas como o cupuaçu, biriba e muruci, ou por outros alimentos crus (NÓBREGA *et al.*, 2009). Um aspecto comum a estes episódios é que todos ocorreram em períodos quentes do ano, em que é maior a atividade biológica do triatomíneo; por exemplo, na Amazônia, cerca de 70% das 59 micro-epidemias registradas até 2005 ocorreram de agosto a dezembro (revisto em DIAS, 2006a).

A doença de Chagas disseminou-se entre as populações rurais latino-americanas acompanhando os movimentos migratórios do homem, que nos últimos três séculos invadiu os locais naturais em que vivem os barbeiros. Nas últimas décadas essa doença vem se tornando mais urbana, em decorrência da crescente migração das pessoas do campo para as cidades, e pelo aumento do número de transfusões de sangue. Os triatomíneos, que eram essencialmente silvestres, tiveram seus hábitos alimentares modificados e passaram a ocupar o peridomicílio, chegando freqüentemente até o interior do domicílio (revisto em PINTO DIAS, SILVEIRA & SCHOFIELD, 2002).

Durante a década de 40, com o advento dos inseticidas sintéticos em associação à melhoria das habitações (substituição da construção em pau-a-pique popularmente conhecida como “cafú”) (**Fig. 7**), o controle vetorial da doença de Chagas foi introduzido no Brasil, seguido por outros países da América do Sul como Argentina, Venezuela e Chile. Em 1991, um acordo assinado pelos países do Cone Sul buscou eliminar de forma integrada, o principal vetor da doença, o *T. infestans*, e reduzir o risco de contaminação pelo *T. cruzi* em transfusões sanguíneas. As metodologias e objetivos desta iniciativa foram coordenados pela Organização Pan-Americana de Saúde e pela Organização Mundial da Saúde (SCHOFIELD & PINTO DIAS, 1999; WHO, 2002; revisto em PINTO DIAS, SILVEIRA & SCHOFIELD, 2002; VINHAES & SCHOFIELD, 2003; MONCAYO, 2003; revisto em SCHMUNIS & CRUZ, 2005).

Em razão do controle eficaz da doença de Chagas, o número de novas infecções foi fortemente reduzido (SCHOFIELD & PINTO DIAS, 1999; WHO, 2002) em todos os países do Cone Sul integrados no acordo. Entre os anos de 1975 e 1995 o Brasil gastou cerca de 500 milhões de dólares na prevenção e no controle das atividades para contenção da doença de Chagas. A análise de custo-benefício demonstrou que, para cada dólar gasto no controle do vetor, US\$ 2,0 foram salvos, enquanto que para os bancos de sangue, apenas US\$ 0,19 retornava. Ou seja, a eliminação da infecção vetorial deve ser sempre prioritária, pois a prevenção ainda é claramente menos dispendiosa (revisto em SCHMUNIS & CRUZ, 2005). O controle efetivo é tido como um objetivo alcançável, dependendo do comprometimento das políticas de Saúde Pública em manter e ampliar os programas de vigilâncias epidemiológicas existentes (PINTO DIAS, SILVEIRA & SCHOFIELD, 2002).

Em mais de 50% dos indivíduos não tratados ou nos quais o tratamento não foi eficiente, o *T. cruzi* pode ser detectado no sangue anos após a infecção ter sido iniciada. Consequentemente, o parasito pode ser transmitido por transfusão sanguínea a um indivíduo não infectado (WHO 1991, 2002). No entanto, nem todos os indivíduos manifestam a doença após receberem sangue contaminado: cerca de 12-20% dos indivíduos infectados na Argentina, Brasil e Chile, e mais de 48% na Bolívia (WHO 1991, 2002).

No Brasil, o número de pessoas infectadas por via transfusional aumentou consideravelmente na primeira metade do século XX, devido à migração da população rural para a região urbana (PINTO DIAS, 1992). Embora o Brasil tenha iniciado na década de 60 a implementação de mecanismos e estratégias para o controle da transmissão transfusional, na década seguinte menos da metade dos serviços de hemoterapia realizava triagem dos doadores visando identificar indivíduos possivelmente infectados pela doença de Chagas.



**Figura 7.** Habitantes de moradia típica das regiões rurais, conhecida como "cafú". Localização do Documento: Fundação Oswaldo Cruz - Casa de Oswaldo Cruz – Biblioteca. *Obtida do sítio:* Biblioteca virtual Carlos Chagas- <http://www.prossiga.br/chagas/>

Desde os anos 60, a Organização Mundial de Saúde recomenda o uso do corante violeta de genciana em serviços hemoterápicos em áreas endêmicas de doença de Chagas (WHO, 1984). Devido à variação na composição deste corante entre os vários fabricantes, ele foi substituído por cristal violeta, seu principal componente, na concentração de 125 mg/500 ml sangue. Seu mecanismo de ação envolve a formação de radicais livres, onde o principal alvo seria a mitocôndria (GADELHA *et al.*, 1989; revisto em DOCAMPO, 1990). O cristal violeta não apresenta efeitos colaterais importantes, porém existem restrições ao seu uso devido a relatos sobre alterações em eritrócitos, carcinogenicidade potencial, e a não-aceitação por pacientes devido à sua cor (THOMAS & MCPHEE, 1984).

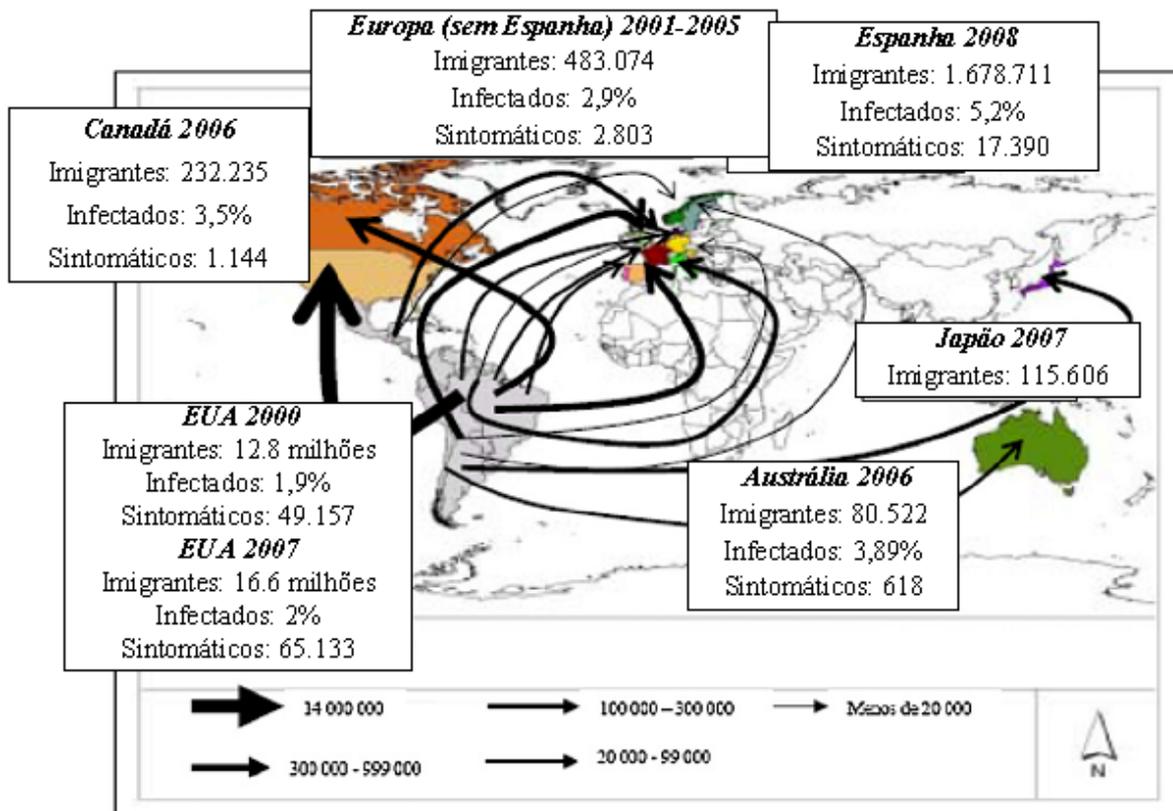
A partir da emergência da SIDA, iniciou-se nos anos 80 um movimento visando à melhoria da qualidade do sangue, com triagem dos doadores por meio de exames sorológicos para detecção da doença de Chagas e quimioprofilaxia em sangue suspeito usando drogas tripanocidas (revisto em PINTO DIAS, SILVEIRA & SCHOFIELD, 2002). Atualmente, como a maioria dos países endêmicos da América Latina realiza triagem em doadores de sangue, a prevalência da infecção por *T. cruzi* entre os doadores caiu rapidamente na maioria dessas regiões (MORAES-SOUZA, 1999; SCHMUNIS *et al.*, 2001; MONCAYO, 2003; revisto em SCHMUNIS & CRUZ, 2005). Em levantamento realizado no Hemocentro de São Paulo (SP) entre 1996 e 2001, foi observado que a prevalência de soros positivos para esta doença diminuiu, atingindo a taxa anual de 1,86 em 10.000 indivíduos (SABINO *et al.*, 2003). No entanto, a infecção pelo *T. cruzi* em países não endêmicos tem se tornado um problema de saúde pública que vem aumentando nas últimas décadas (revisto em

SCHMUNIS, 2007; SCHMUNIS & YADON, 2009) (**Fig. 8**). Em países onde a sorologia para o protozoário não é realizada na seleção de doadores, o risco de recebimento de sangue e transplante de órgãos infectados aumenta em proporção direta à prevalência da infecção dentro da população de doadores e o número de transfusões recebidas, onde os indivíduos que têm que receber múltiplas transfusões são os mais expostos.

Dificuldades econômicas e/ ou problemas políticos fazem a emigração de pessoas de países endêmicos para países desenvolvidos, transformando a doença de Chagas em um problema global. O risco maior ocorre em países que recebem os maiores números de imigrantes: EUA e Espanha (revisto em SCHMUNIS, 2007, SCHMUNIS & YADON, 2009).

Nos EUA, na década de 80, era estimado que 100 mil- 370 mil pessoas tinham infecção crônica pelo *T. cruzi*, e destes, 75 mil apresentavam miocardiopatia crônica (SKOLNICK, 1989; MILEI *et al.*, 1992). Os números atuais devem ser bem maiores, tendo em vista que o censo do ano 2000 mostrou que 35 milhões de hispânicos vivem naquele país, e que são cerca de 45 milhões em 2004 (revisto em SCHMUNIS, 2007). Um número significativo era de imigrantes onde a infecção pelo *T. cruzi* é endêmica.

Além disso, milhares de emigrantes de países endêmicos para a doença de Chagas também vivem no Canadá, países da Europa, Austrália e Japão (revisto em SCHMUNIS, 2007). Nesse último país, há principalmente brasileiros de ancestralidade japonesa, que devido às condições em que viviam no Brasil, se tornaram infectados pelo protozoário. No ano de 2006, estima-se que 3,0% (3088 indivíduos) e 3,5% (5553 indivíduos) dos imigrantes que foram para Austrália e Canadá, respectivamente, estavam infectados pelo *T. cruzi*, sendo que destes 618 e 1111 indivíduos (dos dois países respectivamente) necessitariam de acompanhamento médico (SCHMUNIS & YADON, 2009). Em países europeus (excluindo a Espanha), estima-se que 2,9% (14010 indivíduos) dos imigrantes em 2005 estavam infectados pelo protozoário, e destes, 2803 necessitariam de atenção médica.



**Figura 8.** Fluxo de imigrantes provenientes de países endêmicos para o *T. cruzi*. Número estimado em indivíduos infectados e que potencialmente que devem ter ou desenvolver a doença de Chagas nos países de destino. Adaptado de SCHMUNIS & YADON, 2009

Na Espanha, país europeu que recebe a maioria dos emigrantes, a infecção pelo *T. cruzi* é um problema potencial. De acordo com o Diretorado Geral Político do Ministério do Interior espanhol, havia 297.171 imigrantes legais em 2002 dos 16 países latino-americanos endêmicos para a doença de Chagas. Considerando a prevalência da infecção dentro destes imigrantes similar à prevalência nos bancos de sangue de seus países de origem em 1997-1999 (assumindo que os emigrantes do México para a Espanha tinham melhores condições econômicas do que os que emigraram para o Canadá ou EUA), pode ser estimado que, naqueles anos, 2518 indivíduos eram potencialmente infectados (revisto em SCHMUNIS & CRUZ, 2005; SCHMUNIS, 2007). No ano de 2008, o número de imigrantes na Espanha oriundos de países da América Latina já era de 1.808.771, sendo que 1.678.711 eram de 17 países endêmicos para a doença de Chagas. Estima-se que 5,2% deste total (ou 86.948 indivíduos) estariam infectados e 16.909 pessoas necessitariam de atenção médica (SCHMUNIS & YADON, 2009). No entanto, a imigração ilegal na Espanha é ainda maior do que a legalizada: por exemplo, em 2002, dos 550 mil turistas dos 17 países latino-americanos que entraram na Espanha, apenas 86 mil a deixaram. O

caso extremo é o Equador, de onde 101.432 turistas entraram na Espanha, mas apenas 874 saíram (SCHMUNIS, 2007).

Além destes mecanismos, a infecção congênita também é um problema real nestes países. Na Itália, até 2008, foi detectada sorologia positiva para o *T. cruzi* em 1% das 99 mulheres grávidas latino-americanas; na cidade de Madri, este percentual foi de 18% das 230 mulheres grávidas provenientes da Bolívia, sendo que foi confirmado um caso de transmissão vertical (revisto em SCHMUNIS & YADON, 2009). Nos EUA, estimativas são de que nasçam 189 bebês por ano infectados (MILEI *et al.*, 2009). A doença de Chagas congênita foi também diagnosticada em países como a Suécia e a Suíça.

Nos EUA, há relatos de casos de transmissão autóctone, sendo confirmados 6 casos desse evento. Diversos estudos têm demonstrado a presença do protozoário em diferentes hospedeiros animais em diversos estados daquele país. Guaxinins, crocodilos, gambás e cachorros são os que têm apresentado altos índices de contaminação (MILEI *et al.*, 2009). Estatísticas apontam que 50-59% dos guaxinins estejam infectados na Geórgia, 63% em Oklahoma e até 67% destes no Tennessee, entre outros. No estado da Louisiana, o parasito foi encontrado em até 28,8% dos crocodilos, 35,7% dos gambás e 4,7% dos cães oriundos de zonas rurais. Apesar dos altos índices da presença do *T. cruzi* em diferentes estados, acredita-se ainda em baixa transmissão do mesmo para humanos ao fato de que o inseto vetor está presente em casas frequentemente encontradas em áreas subdesenvolvidas, pouco presentes nos EUA (MILEI *et al.*, 2009). No entanto, mudanças nos ecossistemas parecem favorecer a transmissão da doença. Na península de Yucatán (México), foi relatado um aumento no número de triatomíneos 6 meses após a passagem do furacão Isidora, e 9 meses após a passagem do furacão Katrina por Nova Orleans, foi relatada a infecção autóctone de uma mulher de 74 anos de idade pelo *T. cruzi*, que fora picada repetidamente por diferentes espécies de triatomíneos encontrados em sua casa, onde 56% destes estavam infectados pelo parasito (MILEI *et al.*, 2009).

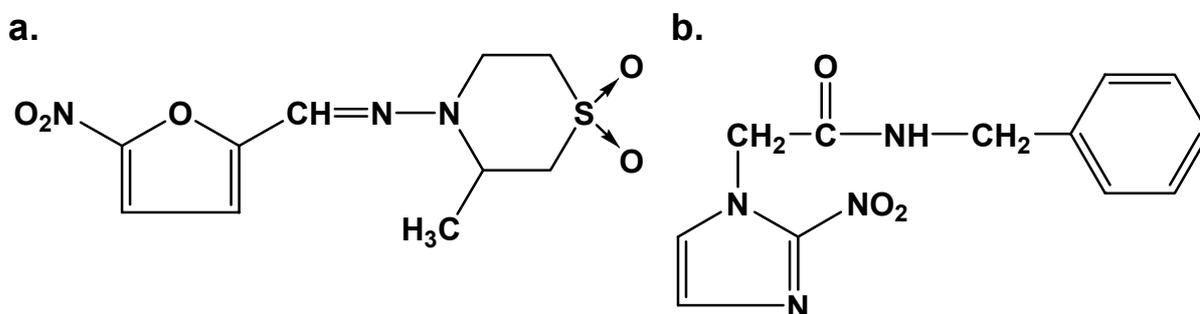
#### 2.4. Tratamento

Doenças parasitárias afetam, no mundo, centenas de milhares de pessoas e resultam em mortalidades significativas, com conseqüências devastadoras para as economias e sociedades. Contudo, a maior parte das drogas disponíveis para o tratamento destas doenças são muito antigas (décadas passadas) e têm, frequentemente, eficácia limitada, efeitos colaterais severos, baixo acompanhamento dos pacientes e progressiva resistência a estes fármacos. Poucas, ou nenhuma, das

atuais drogas disponíveis para doenças parasitárias passaria pelos atuais fases de descobrimento, desenvolvimento e ensaios pré-clínicos e clínicos (RENSLO & MCKERROW, 2006).

Esta realidade se deve à economia, pois apesar de serem doenças globalmente massivas em seus impactos, afetam principalmente pessoas pobres em regiões pobres do mundo, e como tal, não são vistas como mercados-alvo para a indústria farmacêutica. Além disso, os fundos destinados à pesquisa básica destes organismos e suas patogêneses são inadequados se comparados aos fundos destinados a doenças de muito menor prevalência, mas com maiores impactos em países desenvolvidos da Europa e América do Norte (RENSLO & MCKERROW, 2006; WILKINSON & KELLY, 2009). Nos últimos 25 anos, foram desenvolvidas cerca de 1400 novas drogas, sendo que destas, somente cerca de 1% foi dirigida a doenças tropicais (TROUILLER *et al.*, 2002).

Dentro deste contexto, o tratamento clínico para a doença de Chagas (revisto em STEVERDING & TYLER, 2005) vem sendo feito com as mesmas duas drogas que foram descobertas empiricamente três décadas atrás: (a) Nifurtimox (Lampit®, Bayer; 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), que teve sua produção descontinuada em 1997 devido à baixa demanda; e (b) Benznidazol (Rochagan®, Roche; N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) (**Fig. 9**). El Salvador retomou a produção do nifurtimox no ano 2000 para o uso no tratamento clínico da doença do sono, causada pelo protozoário *T. brucei* (JANNIN & VILLA, 2007). A empresa Roche também interrompeu a produção do benznidazol no Brasil no ano de 2005, e cedeu a patente ao governo brasileiro, que por intermédio do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) passou a fabricar, comercializar e exportar o fármaco.



**Figura 9.** Fórmulas dos dois nitroderivados utilizados no tratamento da doença de Chagas. a: Nifurtimox; b: Benznidazol

Os resultados obtidos com o uso de Nifurtimox e Benznidazol variam com a fase da doença de Chagas em que são usados, o período de tratamento e a dose, idade e

origem geográfica dos pacientes, provavelmente devido à diferença de susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* (revisto em COURA & DE CASTRO, 2002). Em geral, os resultados são considerados bons no tratamento de casos agudos e recentes da infecção (ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA ESTANI *et al.*, 1998; CANÇADO, 1997, 1999), principalmente em crianças (até 15 anos de idade), estimando-se um percentual médio de cura parasitológica em torno de 80% (DIAS, 2006a). O Benznidazol tem sido relativamente eficaz em casos de reativação da doença de Chagas, tanto após transplante de órgãos e medula óssea (negativação da parasitemia) (ATCLAS *et al.*, 1999, 2005; DIEZ *et al.*, 2007; GALLERANO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008), como em pacientes com SIDA (melhoria das condições clínicas e redução da parasitemia) (NISHIOKA *et al.*, 1993; SARTORI *et al.*, 1998, 2002; MADALOSSO *et al.*, 2004; BURGOS *et al.*, 2005; CORDOVA *et al.*, 2008).

A maior limitação destas drogas é a baixa atividade na fase crônica da doença, pois a eficiência terapêutica é de difícil monitoramento (VIOTTI *et al.*, 1994; CANÇADO, 1997). Além disso, os efeitos colaterais apresentados são sérios, o que faz, em alguns casos, o tratamento ser temporariamente suspenso ou até mesmo abandonado. O tratamento com Nifurtimox gera efeitos como anorexia, emagrecimento, alterações químicas, excitabilidade, sonolência e manifestações digestivas. E no caso do Benznidazol, além dos citados, incluem dermatites com erupção cutânea, edema generalizado, febre, enfartamento ganglionar, dores articulares e musculares, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica. A prescrição do tratamento na fase crônica é controversa, devido às dificuldades em monitorar sua eficiência terapêutica (COURA, 1996).

Alguns estudos farmacocinéticos têm sido realizados visando uma diminuição da toxicidade, além de uma melhor absorção e biodisponibilidade das drogas usadas no tratamento da doença de Chagas, principalmente o Benznidazol, com conseqüente redução das doses prescritas e conseqüentemente, dos efeitos colaterais (LAMAS *et al.*, 2006). Portanto, além dos fatores mencionados acima, estas duas drogas não são ideais também por requererem longos períodos de administração (30-60 dias) sob supervisão médica especializada, ausência de formulações pediátricas específicas e representarem um tratamento de alto custo (o tratamento com Nifurtimox custa em torno de 48 dólares, valor equivalente ao salário mensal de um mineiro bolivariano) (revisto em COURA & DE CASTRO, 2002). Assim, a busca por novos agentes quimioterápicos eficazes, mais específicos e menos dispendiosos é um campo de interesse na área de pesquisa em doença de Chagas.

A atividade antiparasitária do Nifurtimox envolve a redução metabólica do grupo nitro por nitroredutases, gerando radicais nitroaniônicos instáveis, altamente reativos

com oxigênio, produzindo o íon superóxido e peróxido de hidrogênio, que são altamente tóxicos (revisto em DOCAMPO & MORENO, 1986; DOCAMPO, 1990). O *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxificação para metabólitos de oxigênio, e deste modo é mais sensível a esses produtos que a célula hospedeira (BOVERIS *et al.*, 1980; MORELLO, 1988; revisto em DOCAMPO, 1990).

O Benznidazol parece agir sobre o *T. cruzi* por um mecanismo diferente, pois em concentrações nas quais o nitroderivado apresenta atividade tripanocida não ocorre geração de íon superóxido e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MORENO *et al.*, 1982; revisto em DOCAMPO, 1990). A ação deste composto sobre o parasito parece envolver modificação covalente de macromoléculas, ou outras interações dos produtos intermediários de nitro-redução com componentes celulares (POLAK & RICHLE, 1978; GOIJMAN, FRASCH & STOPPANI, 1985; DIAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; revisto em DOCAMPO, 1990), ou uma ação inibitória direta sobre a atividade da DNA topoisomerase do parasito (RIOU *et al.*, 1984).

Embora a quimioterapia da doença de Chagas pertença a uma área de pesquisa acadêmica muito intensa (revisto em DE CASTRO, 1993; COURA & DE CASTRO, 2002; URBINA & DOCAMPO, 2003; DARDONVILLE, 2005; STEVERDING & TYLER, 2005; CROFT, FRASCH & STOPPANI, 2005), as indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos contra esta doença, por serem esses programas muito caros, especulativos e longos, não sendo assim justificáveis em uma base puramente comercial (GUTTERIDGE, 1987; WILKINSON & KELLY, 2009).

Entre as pesquisas direcionadas à quimioterapia da doença de Chagas, alguns compostos têm sido selecionados como os mais promissores. Podem ser citados: (a) inibidores específicos da biossíntese de ergosterol (revisto em URBINA *et al.*, 2003; RODRIGUES & DE SOUZA, 2008; DE SOUZA & RODRIGUES, 2009), funcionando no nível da C14- $\alpha$  esterol demetilase (como o cetoconazol, albaconazol, o TAK-187 e o posoconazol) (LAZARDI, URBINA & DE SOUZA, 1990; CONTRERAS, VIVAS & URBINA, 1997; LIENDO, LAZARDI, & URBINA, 1998; URBINA *et al.*, 1995, 2004; GUEDES *et al.*, 2004; CORRALES *et al.*, 2005; FERRAZ *et al.*, 2007) e da squaleno sintase (como os compostos E5700 e ER-119884) (BRAGA, URBINA & DE SOUZA, 2004), da oxidoesqualeno ciclase ou da 24-C-metiltransferase (CONTRERAS, VIVAS & URBINA, 1997; URBINA *et al.*, 1995, 1996; BRAGA *et al.*, 2005); (b) inibidores da farnesil pirofosfato sintase, como os N-alkil-bifosfonatos, que se acumulam seletivamente nos acidocalcisomos dos parasitos (MARTIN *et al.*, 2001; DOCAMPO & MORENO, 2001; GARZONI *et al.*, 2004); (c) inibidores da cruzipaina, uma protease essencial e específica do parasito, como por exemplo os derivados da vinil N-sulfonil hidroxilamina (CAZZULO, 2002); (d) inibidores do metabolismo e síntese da

tripanotiona (SCHMIDT & KRAUTH-SIEGEL, 2002; revisto em RIVAROLA & PAGLINI-OLIVA, 2002; MENEZES *et al.*, 2006;); (e) inibidores da hipoxantina guanina fosforibosil transferase (AVILA, AVIAL & MONZÓN, 1984; GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.*, 2000; GOBBI *et al.*, 2007) (revisto em COURA & DE CASTRO, 2002; CROFT, FRASCH & STOPPANI, 2005; STEVERDING & TYLER, 2005; SOEIRO & DE CASTRO, 2009; URBINA, 2009).

Análogos de lisofosfolípídeos como a ilmofosina, miltefosina e edelfosina, também demonstraram agir sobre o *T. cruzi* (SANTA-RITA *et al.*, 2000) pela inibição específica da fosfatidilcolina do parasito através da via de Greenberg (LIRA *et al.*, 2001). A miltefosina também foi capaz de reduzir a parasitemia no modelo experimental da fase aguda da doença de Chagas em camundongos (SARAIVA *et al.*, 2003), e a edelfosina quando combinada com cetoconazol apresentou efeito potencializado sobre o parasito (SANTA-RITA *et al.*, 2005; SANTA-RITA, BARBOSA & DE CASTRO, 2006). Além desses, diamidinas aromáticas, tais como a pentamidina, já usadas na terapia e profilaxia das tripanosomíases africanas e leishmaniose visceral resistente ao tratamento com antimoniais (revisto em WERBOVETZ, 2006; MATHIS *et al.*, 2006), pela inibição de diferentes classes de enzimas tais como proteases, topoisomerases e polimerases, e também usadas na forma de análogos ou como novos compostos classificados como amidinas reversas, têm apresentado efeitos promissores em ensaios *in vitro* e *in vivo* (DE SOUZA *et al.*, 2004, 2006; SOEIRO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007a, 2007b, 2008; DALIRY *et al.*, 2009; BATISTA *et al.*, 2009).

Apesar da extensa lista de classes de compostos testadas *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*, após a introdução do Nifurtimox e do Benznidazol apenas alopurinol (TOMIMORI-YAMASHITA *et al.*, 1997; APT *et al.*, 1998), cetoconazol (BRENER *et al.*, 1993), itraconazol e fluconazol (SOLARI *et al.*, 1993; APT *et al.*, 2003) foram submetidos a ensaios clínicos, porém com resultados pouco animadores (DE CASTRO, 1993; COURA & DE CASTRO, 2002). No entanto, recentemente foi relatado um tratamento de sucesso com o posoconazol em associação a um prévio tratamento com benznidazol, em uma paciente com lúpus eritematoso e doença de Chagas crônica, cuja parasitemia se mostrou negativada por PCR ao longo de treze meses após o início do tratamento (PINAZO *et al.*, 2010).

Por fim, há alguns aspectos para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias e seleção de possíveis candidatos: (i) o custo, pois a produção e a distribuição do fármaco não deve ser cara; (ii) as drogas devem ser ministradas preferencialmente por via oral, já que outras vias de administração dificultam a aplicação e o alcance a todas as regiões de uma sociedade (por exemplo, zonas rurais); (iii) devem ser seletivas e

de grande tolerância pelo organismo, minimizando os efeitos colaterais; (iv) devem levar à morte dos parasitos de tal maneira que os restos dos mesmos possam ser reconhecidos por células do sistema fagocítico, serem internalizados e digeridos sem induzir respostas não desejáveis do sistema imune (revisto em RENSLO & MCKERROW, 2006; CRAGER & PRICE, 2009).

### 3. Produtos naturais

Diversas e numerosas classes de produtos naturais foram isoladas e tiveram suas estruturas caracterizadas no século passado (revisto em BASSO *et al.*, 2005). As ferramentas para a elucidação dos mecanismos biológicos e bioquímicos dos produtos naturais com ação terapêutica têm valor inestimável no desenvolvimento de plataformas para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN, CRAGG & SNADER, 2000). Produtos naturais e seus derivados tradicionalmente são as fontes mais comuns, e ainda representam mais de 30% do mercado farmacêutico corrente (KIRKPARTICK, 2002). Entre os anos de 1981 e 2002, das 877 pequenas moléculas introduzidas nas Novas Entidades Químicas (NEQs), quase a metade (49%) foram oriundas de produtos naturais ou análogos sintéticos ou semi-sintéticos baseados em compostos presentes nos mesmos (NEWMAN, CRAGG & SNADER, 2003). Produtos naturais ainda são a maioria das fontes para a inovação de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas (de origens bacterianas, fúngicas e parasíticas), câncer, desordens lipídicas e imunomodulação (ALTMANN, 2001).

Há numerosas fontes de produtos naturais que têm mostrado grande valor terapêutico: esponjas, cianobactérias, mixobactérias, microrganismos de solo, dinoflagelados, entre muitos outros (revisto em BASSO *et al.*, 2005). A tendência de busca e exploração da biodiversidade para a identificação e isolamento de compostos com potencial terapêutico também foi observada na busca de compostos tripanosomicidas e leishmanicidas obtidos de extratos naturais crus (revisto em AKENDENGUE *et al.*, 1999; FOURNET & MUÑOZ, 2002; ANTHONY, FYFE & SMITH, 2005). Um exemplo é o ácido úsnico isolado do líquen *Cladonia substellata* (DE CARVALHO *et al.*, 2005), e poliquetídeos isolados da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus* (KOSSUGA *et al.*, 2008) também apresentaram efeitos antiparasitários *in vitro*.

A indústria da química orgânica tem avançado em tecnologias que permitem que os produtos e compostos isolados sejam produzidos sinteticamente em larga escala, diminuindo muito a barreira da pesquisa de moléculas de origem natural, com custos menores dos que já foram no passado. Um dos exemplos disto é o discodermolide, um

potente produto natural antitumoral, que consegue ser sintetizado em grandes quantidades e que mostra que mesmo compostos com estruturas muito complexas podem ser produzidos (GUNASEKERA *et al.*, 2004).

Por milhares de anos, a medicina e os produtos naturais estiveram intimamente ligados pelo uso de remédios tradicionais e venenos naturais (NEWMAN, CRAGG & SNADER, 2000). A artemisinina, composto ativo da erva chinesa “qinghao” (*Artemisia annua*), tradicionalmente utilizada para o controle de febres, é fonte de vários derivados semi-sintéticos desenvolvidos nas duas últimas décadas para o tratamento da malária, tais como arteether, o artemether e o artesuanto (HAYNES, 2001). O galantamine, composto ativo do Reminil, usado no tratamento do mal de Alzheimer foi isolado originalmente de planta *Galanthus* spp., e posteriormente da *Narcissus* spp. (revisto em BUTLER, 2004). O pigmento fenólico amarelo do curry, a curcumina, teve iniciado seu uso em teste clínicos em pacientes com mal de Alzheimer, no Centro de Pesquisas em Mal de Alzheimer da Universidade de Califórnia, Los Angeles, desde que se mostrou capaz de inibir a formação de oligômeros  $\beta$ -amilóides e fibrilas e de quebras de placas  $\beta$ -amilóideas nos cérebros de camundongos (YANG *et al.*, 2005).

Tem sido estudada a atividade de diferentes extratos de plantas (FOURNET *et al.*, 1992, FOURNET, BARRIOS & MUÑOZ, 1994; MITTAL *et al.*, 1998; JARAMILLO *et al.*, 2000; PLOCK, SOKOLOWSKA-KOHLER & PRESBER, 2001; MENNA-BARRETO *et al.*, 2005; LUIZE *et al.*, 2006) principalmente obtidas em zonas de clima tropical, bem como diferentes classes de análogos semi-sintéticos e compostos isolados, como alcalóides, terpenos, acetogeninas, lignanas, cumarinas, chalconas, lactonas, tetralonas e saponinas. O extrato de própolis (DANTAS *et al.*, 2006; SALOMÃO *et al.*, 2009) e óleos essenciais oriundos de diferentes partes vegetais (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; DO SOCORRO *et al.*, 2003; SANTORO *et al.*, 2007a, 2007b; MENNA-BARRETO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009) também têm sido amplamente testados sobre as diferentes formas de tripanosomatídeos patogênicos como *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

As toxinas de animais e seus alvos constituem um mundo diverso, e seus efeitos farmacológicos específicos de interação podem fornecer protótipos para agentes terapêuticos altamente específicos (KINI, 1998). Além disso, a alta afinidade e seletividade das toxinas as tornam mais usuais em experimentos funcionais do que os agentes farmacológicos padrões (HARVEY *et al.*, 1998) (**Tabela 1**).

Várias toxinas já foram isoladas e têm sido utilizadas como agentes terapêuticos, como exemplo o medicamento Botox, desenvolvido a partir da toxina que a bactéria *Clostridium botulinum*, em condições anaeróbicas, excreta e que bloqueia a liberação de acetilcolina, inibindo a contração muscular (GARZA *et al.*, 2003).

O Captopril, medicamento utilizado no controle da hipertensão arterial, é derivado de um peptídeo presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca* e tem ação como inibidor da enzima conversora de angiotensina (ACE) (HARVEY *et al.*, 1998) e é hoje a terceira droga mais vendida no mundo (MASSENSINI, 2003) (**Tabela 2**).

Nome	Toxina/ Origem	Mecanismo de ação	Uso
Reagente-Reptilase®	Batroxobina: serino proteinase de <i>Bothrops</i>	Converte o fibrinogênio em fibrina por meio da liberação exclusiva de fibrinopeptídeo A do fibrinogênio	Estudos sobre a conversão do fibrinogênio em fibrina.
Protac®	Serino proteinase do veneno de <i>Agkistrodon contortix</i>	Ativação direta da proteína C do plasma	Determinação dos níveis de proteína C e S
Batrocetin®	Proteína agregadora de plaquetas de <i>B. jararaca</i> (e outras <i>Bothrops</i> )	Aumenta a afinidade do domínio A1 do vWF pelo receptor GPIb $\alpha$ das plaquetas	Pode ser usado no estudo do vWF no plasma. Agrega plaquetas fixadas com formalina
RVV-V	RVV-V é uma serino proteinase do veneno de <i>Vipera russelli</i>	Ativação proteolítica do fator V	Pode ser usada para desestabilizar e inativar seletivamente o fator V do plasma e assim preparar um reagente de rotina para determinação deste fator.

**Tabela 1:** Algumas toxinas utilizadas como ferramentas diagnósticas. Modificada de FOX & SERRANO, 2007. vWF: fator von Willebrand.

A droga Ancrod (Viprenex<sup>TM</sup>), derivada do veneno da *Calloselasm rhodostoma* (cobra Malaia), é um potente defibrinogenante e que está em fase III de triagem para o tratamento de isquemia aguda (ALBERS *et al.*, 2001) (**Tabela 3**).

Peptídeos antimicrobianos isolados de insetos e venenos animais tais como apidaecinas, defensinas, cecropina e melitina, dentre outros, também apresentam atividades microbicidas e antiprotozoárias (CASTEELS *et al.*, 1989; DE LUCCA *et al.*, 1998; DAGAN *et al.*, 2002; VIZIOLI & SALZET, 2002; MCGWIRE *et al.*, 2003). A melitina também exibiu atividade leishmanicida (DIAZ-ACHIRICA *et al.*, 1998; CHICARRO *et al.*, 2001; LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2003), por meio da permeabilização

de membranas e lise em uma maneira não-seletiva (PAPO & SHAI, 2003; revisto em RAGHURAMAN & CHATTOPADHYAY, 2007). Jeleínas e a roialisina são peptídeos isolados da geléia real produzida por abelhas trabalhadoras de *Apis mellifera* e que apresentaram excelentes atividades bactericidas contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (FUJIWARA *et al.*, 1990; FONTANA *et al.*, 2004).

Nome da droga	Toxina/ Origem	Indicação	Mecanismo de ação	Links de sítios da FDA na internet
<b>Doença: Hipertensão</b>				
Captopril®	Peptídeos potenciadores de bradicinina do veneno de <i>B. jararaca</i>	Tratamento da hipertensão	Inibição da enzima conversora de angiotensina	<a href="http://www.fda.gov/cder/foi/anda/97/74532ap.pdf">www.fda.gov/cder/foi/anda/97/74532ap.pdf</a>
<b>Doença: Coagulopatias/ doenças do coração</b>				
Aggrastat® (Tirofiban)	Estrutura não-peptídica baseada na sequencia RGD das desintegrinas de venenos de serpentes	Tratamento de angina	Antagonista reversível do receptor glicoprotéico (GP) IIb/IIIa de plaquetas; inibe agregação plaquetária	<a href="http://www.fda.gov/cder/foi/label/1998/209121b1.pdf">www.fda.gov/cder/foi/label/1998/209121b1.pdf</a>
Integrilin® (Eptifibatide)	Estrutura baseada na sequencia KGD da desintegrina barbourina de <i>Sistrurus barbouri</i>	Usado em angioplastia coronariana	Antagonista do receptor glicoprotéico (GP) IIb/IIIa de plaquetas humanas; ; inibe agregação plaquetária	<a href="http://www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20718_INTEGRILIN_pharmr_P1.pdf">www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20718_INTEGRILIN_pharmr_P1.pdf</a>
<b>Doença: Dor crônica</b>				
Prialt® (Ziconotide)	$\omega$ -conotoxina MVIIA do molusco marinho <i>Conus magus</i>	Tratamento de dor crônica severa	Bloqueia canais de $Ca^{+2}$ do tipo N	<a href="http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2004/21-060_Prialt_pharmr.PDF">www.fda.gov/cder/foi/nda/2004/21-060_Prialt_pharmr.PDF</a>
<b>Doença: Diabetes</b>				
Byetta® (Exenatide)	Exendin-4 (peptídeo de 39 aminoácidos mimetiza a saliva do lagarto <i>Heloderma suspectum</i> )	Melhora no controle do açúcar no sangue em adultos com Diabetes Mellitus do tipo 2	Ligação e ativação do receptor GLP-1 para reduzir a glicose do plasma e menor HbA <sub>1c</sub>	<a href="http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2005/021773_Byetta_pharmr.PDF">www.fda.gov/cder/foi/nda/2005/021773_Byetta_pharmr.PDF</a>

**Tabela 2:** Drogas baseadas em toxinas aprovadas pela U. S. Food and Drug Administration (FDA). Modificada de FOX & SERRANO, 2007.

O veneno de *A. mellifera* também possui efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, que são propriedades de drogas anti-inflamatórias não-esteróides (KNOW *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004). Estudos prévios relataram que este veneno impediu o crescimento de células de carcinoma hepático, mamário, osteosarcoma e leucemia (ORSOLIC *et*

*al.*, 2003; CHU *et al.*, 2007; MOON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2006). A fosfolipase A<sub>2</sub> secretada, que é um pequeno componente deste veneno, é capaz de agir sinergicamente com o fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato para afetar a integridade de membrana e causar subsequente morte em células renais cancerosas (GRISOTTO *et al.*, 2006; PUTZ *et al.*, 2007). A fosfolipase A<sub>2</sub> deste veneno também apresenta atividade antiparasitária sobre o *T. brucei brucei* e bactericida sobre as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* (BOUTRIN, FOSTER & PENTREATH, 2008).

Nome da droga	Toxina/ Origem	Indicação	Nome da triagem clínica	Fase da triagem clínica/ link
Alfimeprase	Análogo recombinante da fibrolase, uma metaloproteínas e P-I do veneno de <i>Agkistrodon contortrix</i>	Tratamento de doenças oclusivas arterianas	Estudo da habilidade do Alfimeprase de rapidamente dissolver os coágulos sanguíneos na perna e prevenindo a necessidade de cirurgia nas artérias da perna	Fase III <a href="http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00115999?order=1">www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00115999?order=1</a>
Viprinex™	Ancrod: serino proteinase de <i>Agkistrodon contortrix</i>	Agente desfibrinogenante	Ancrod (Viprinex™) para o tratamento de infarto isquêmico agudo	Fase III <a href="http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00141011?order=1">www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00141011?order=1</a>
Desmoteplase	Ativador do plasminogênio da saliva do morcego vampiro <i>Desmodus rotundus</i>	Para infarto isquêmico agudo	Estudo da Desmoteplase (Nome Internacional Não Proprietário [INN]) em infarto isquêmico agudo (DIAS-2)	Fase III <a href="http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00111852?order=1">www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00111852?order=1</a>
Cilengitide (EMD 121974)	Peptídeo Arg-Gli-Asp cíclico. Inibidor de integrinas alfa-v	Na contenção do crescimento e disseminação de células tumorais	Cilengitide no tratamento de pessoas destinadas a cirurgia de glioblastoma multiforme recorrente ou progressivo.	Fase II <a href="http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00112866?order=1">www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00112866?order=1</a>
Chlorotoxin (131I-TM-601)	Bloqueador de canais de cloro do escorpião <i>Leiurus quinquestriatus</i>	Sobre gliomas malignos	Ligando-se a um complexo protéico na superfície das células do glioma contendo diversas proteínas implicadas na invasão celular do tumor	Fase II <a href="http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00114309">www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00114309</a>

**Tabela 3:** Drogas baseadas em toxinas aprovadas para triagens clínicas nos EUA. Modificada de FOX & SERRANO, 2007.

Diversos peptídeos antimicrobianos e com variadas aplicabilidades terapêuticas também foram isolados dos venenos e secreções de diferentes espécies de anuros (revisto em NASCIMENTO *et al.*, 2003; CONLON, KOLODZIEJEK & NOWOTNY, 2009), e apresentam fortes atividades contra bactérias (BROGDEN, 2005; URBÁN *et al.*, 2007), fungos (DE LUCCA *et al.*, 1998) e protozoários, incluindo tripanosomatídeos

(HERNANDEZ *et al.*, 1992; BRAND *et al.*, 2006, 2002; MANGONI *et al.*, 2005; revisto em RIVAS, LUQUE-ORTEGA & ANDREU, 2009). Alguns destes peptídeos também apresentam atividades antitumorais com baixa toxicidade às células sadias, tanto por dispararem o processo de apoptose quanto pela formação de canais iônicos/ poros (SOBALLE *et al.*, 1995; ELLERBY *et al.*, 1999; JOHNSTON *et al.*, 2000; MAI *et al.*, 2001; RISSO *et al.*, 2002).

Neste contexto, os venenos animais surgem como uma alternativa de novas classes de drogas terapêuticas contra protozoários parasitos a ser explorada.

### **3.1. Serpentes e seus venenos**

As espécies que constituem a herpetofauna estão distribuídas em nove famílias, porém, apenas duas pertencem ao grupo das peçonhentas: a Elapidae e a Viperidae. A família Elapidae é representada somente pelo gênero *Micrurus* (cobra coral). Já a família Viperidae é representada pelos gêneros (a) *Bothrops* e *Porthidium* (jararacas), (b) *Crotalus* (cascavel) e (c) *Lachesis* (Surucucu). As serpentes da família Viperidae, sub-família Crotalinae, possuem presas situadas anteriormente e no maxilar superior, sendo estas grandes, amplamente móveis e providas de canal central, por onde escorre o veneno. As presas são móveis, permanecendo deitadas ao longo do maxilar superior, cobertas por uma bainha, podendo voltar-se para frente, no momento do bote. Devido a este tipo de dentição são chamadas solenóglifas (JORGE & RIBEIRO, 1990).

O veneno das serpentes é sintetizado e secretado por glândulas especializadas localizadas próximas às presas inoculadoras. A composição e as atividades biológicas dos venenos variam de acordo com a família, gênero e espécies das cobras, bem como nos seus habitats, dieta alimentar e sexo (TSAI *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2006; BARLOW *et al.*, 2009; NUÑEZ *et al.*, 2009). A função primária dos venenos é imobilizar e matar a presa, e simultaneamente iniciar a sua digestão, aumentando assim a eficiência da sua assimilação (THOMAS & POUGH, 1979; HAYES, 1992). O veneno é uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, compostos orgânicos, carboidratos, íons e sais. Atualmente 1.033 toxinas biologicamente ativas foram isoladas do veneno de serpentes (THEAKSTON & KAMIGUTI, 2002).

As principais atividades observadas são desencadeadas por fosfolipases, fosfodilesterases, fosfomonoesterases, L-amino ácido oxidases, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas das classes serino e metalo-protease, arginina esterases, 5-nucleotidases, hialuronidases e NAD-nucleosidases (STOCKER, 1999). Os peptídeos encontrados podem apresentar atividade neurotóxica, pré-sinápticas, pós-sinápticas ou ainda atuar como ligantes de canais de potássio. Os componentes do veneno ainda

podem apresentar atividades citotóxica, miotóxica, cardiotoxica ou inibitória da agregação plaquetária. Dentre os componentes citados, os relacionados com o sistema hemostático foram os primeiros a serem estudados e, atualmente, são de grande aplicabilidade terapêutica (BRAUD *et al.*, 2000).

Os venenos de serpentes também têm sido usados como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de diversos tumores (NEWMAN *et al.*, 1993; PAI *et al.*, 1996; ZHOU *et al.*, 2000; CORRÊA JR. *et al.*, 2002; PAPO *et al.*, 2004; PAPO & SHAI, 2003; ARAYA & LOMONTE 2007; EL-RAFAEL & SARKAR, 2009) (**Tabela 3**).

Muito é conhecido sobre os efeitos farmacológicos das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s). Mais de 280 destas enzimas isoladas de venenos de cobras têm sido relatadas durante décadas, como pode ser verificado no sítio: [http://sdmc.lit.org.sg/Templar/DB/snaketoxin\\_PLA2/index.html](http://sdmc.lit.org.sg/Templar/DB/snaketoxin_PLA2/index.html)), sendo que muitas destas apresentam diversos efeitos tóxicos, incluindo neurotoxicidade, mitotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, anticoagulação, convulsivo, hipotensivo e efeitos pró-inflamatórios (revisto em ROUAULT *et al.*, 2006).

*In vitro*, fosfolipases oriundas de venenos de serpentes têm apresentado diversos efeitos farmacológicos, como modular a migração e a proliferação celular (RUFINI, *et al.*, 1996; RIZZO *et al.*, 2000), atividade bactericida (SANTAMARIA *et al.*, 2005), e apresentarem um forte efeito inibitório contra HIV-1 (FENARD *et al.*, 1999) e *Plasmodium falciparum* (ZIELER *et al.*, 2001). A crotoxina (uma PLA<sub>2</sub> citotóxica) isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* está sendo usada na fase I de triagem clínica para o tratamento de pacientes com tumores sólidos (CURA *et al.*, 2002).

Nos venenos de serpentes também há desintegrinas naturais e que têm sido utilizadas como potentes inibidores de diversas integrinas, e que teriam ações terapêuticas no tratamento de cânceres (incluindo menor crescimento do tumor, inibição da angiogênese e metástase), em síndromes isquêmicas coronarianas agudas e mal de Alzheimer (revisto em KOH, ARMUGAM & JEYASEELAN, 2006).

Estudos anteriores mostraram que o veneno de serpentes apresenta atividade contra *Leishmania* spp. (FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 1994; TEMPONE *et al.*, 2007; PASSERO *et al.*, 2007). Estudos recentes mostraram que o veneno bruto das serpentes do gênero *Bothrops* sul-americanas inibiram o crescimento de formas promastigotas de *L. major* e epimastigotas de *T. cruzi* (GONÇALVES *et al.*, 2002), além de induzir morte celular programada nestes últimos (DEOLINDO *et al.*, 2005).

Os venenos de *Cerastes cerastes* e *Naja haje* inibiram a proliferação de epimastigotas do *T. cruzi*, sendo que o veneno de *C. cerastes* também foi ativo contra

as formas tripomastigotas (FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 1994). Contudo, os componentes ativos ainda não foram isolados e caracterizados. L-Amino ácido oxidases obtidas de venenos de serpentes também apresentaram atividade antiviral (vírus da Dengue) e antiprotozoária (TEMPONE, *et al.*, 2001; TOYAMA *et al.*, 2006; CISCOTTO *et al.*, 2009).

### 3.2. O veneno da *Crotalus viridis viridis*, nosso objeto de estudo.

*Crotalus viridis viridis* (abreviação Cvv) (**Fig. 10**) é uma serpente conhecida genericamente como cascavel, e que habita a região leste das montanhas rochosas dos EUA, do sudeste do Canadá ao norte do México e seus microhabitats incluem pradarias, lavouras e desertos (TSAI *et al.*, 2003).

Os efeitos patofisiológicos dos venenos de serpentes são variados e numerosos, mas no caso das cascavéis, os efeitos locais mais sérios são a formação de edemas, hemorragia e mionecrose, e letalidade devida principalmente à ação sinérgica entre os fatores hemorrágicos e vasoativos presentes nos venenos (MEBS & OWNBY, 1990). Os sintomas mais comuns destes efeitos são hipotensão, aumento da permeabilidade vascular e aumento da tonicidade da musculatura lisa visceral.



**Figura 10.** *Crotalus viridis viridis* (Cvv), popularmente conhecida como “cascavel”. Imagens obtidas dos sítios: [www.nowpublic.com/style/western-prarie-rattlesnake-crotalus-iridis-iridis](http://www.nowpublic.com/style/western-prarie-rattlesnake-crotalus-iridis-iridis) e [www.posters.snngr.com/posters/posters.php?item=3534536](http://www.posters.snngr.com/posters/posters.php?item=3534536).

Os sérios danos causados pós-envenenamento nos tecidos, como hemorragia e mionecrose, são atribuídos a alguns componentes do veneno de Cvv já anteriormente descritos, como a viriditoxina (FABIANO & TU, 1981), viridina (SCARBOROUGH *et al.*, 1993), crotavirina (LIU, PENG & HUANG, 1995), a miotoxina *a* com seus respectivos isômeros (OWNBY, CAMERON & TU, 1976; CAMERON & TU, 1977; NEDELKOV & BIEBER, 1997), uma miotoxina de 45 resíduos de aminoácidos (GRIFFIN & AIRD, 1990) e uma PLA<sub>2</sub> miotóxica (OWNBY, COLBERG & WHITE, 1997). OWNBY,

COLBERG & LI (1994) descreveram que as proteínas hemorrágicas no veneno de Cvv, bem como as de outras espécies de *Crotalus*, são resistentes a fervura por 5 minutos a 100 °C. Somado a estes componentes, ainda foram descritos um peptídeo inibidor de bradicinina (BIP) com efeito hipertensivo (GRAHAM *et al.*, 2005), uma enzima do tipo calicreína e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) (WERMELINGER *et al.*, 2005), ambos com efeito contrário ao BIP, hipotensivo (KOMORI, NIKAI & SUGIHARA, 1988) (**Tabela 4**).

A mionecrose induzida por venenos de serpentes ocorre em função da ação de diferentes tipos de toxinas. Estas incluem as pequenas e básicas miotoxinas e as maiores e também básicas proteínas que têm uma sequência primária de uma fosfolipase A<sub>2</sub>, e que podem ter ou não atividade catalítica (MEBS & OWNBY, 1990).

Nome do componente	Local/ Efeito da ação	Referência
Miotoxina a e seus dois isômeros	Polipeptídeo miotóxico não hemorrágico	OWNBY , CAMERON & TU, 1976; CAMERON & TU, 1977; NEDELKOV & BIEBER, 1997
Miotoxina de 45 polipeptídeos	Miotoxina homóloga a miotoxina a	GRIFFIN & AIRD, 1990
Enzima do tipo kalikreína	Proteína não hemorrágica que induz hipotensão pela liberação de bradicinina.	KOMORI, NIKAI & SUGIHARA, 1988
Crotavirina/ Viridina	Proteína do tipo desintegrina com efeito hemorrágico pela inibição da agregação de plaquetas	LIU, PENG & HUANG, 1995; SCARBOROUGH <i>et al.</i> , 1993
PLA <sub>2</sub> miotóxica	Fosfolipase com atividade catalítica miotóxica.	OWNBY, COLBERG & WHITE, 1997
Metaloproteinases de alto peso molecular	Metaloproteinases de 54, 62 e 68 kDa altamente hemorrágicas	LI, COLBERG & OWNBY, 1993. KOMORI <i>et al.</i> , 1994
Viriditoxina	Proteína ácida, de 115 kDa com atividade hemorrágica, hemolítica e miotóxica	FABIANO & TU, 1981
Peptídeo inibidor de bradicinina (BIP)	Peptídeo de 10,63 kDa com efeito hipotensor pela inibição da bradicinina	GRAHAM <i>et al.</i> , 2005
Peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs)	Três peptídeos de baixo peso molecular e que exibem atividade hipotensora pela liberação de bradicinina	WERMELINGER <i>et al.</i> , 2005
Dipeptidil peptidase IV (DPP IV)	Serino proteinases que neutralizariam respostas hipertensivas resultantes do envenenamento de uma presa pela destruição dos hormônios hipertensivos	AIRD, 2008

**Tabela 4:** Resumo dos componentes já identificados no veneno de Cvv.

Pequenas miotoxinas compõem uma classe única de polipeptídeos básicos dos venenos de *Crotalus* spp., com altos pontos isoelétricos e que causam severa necrose nos músculos por um mecanismo não enzimático (GRIFFIN & AIRD, 1990). A miotoxina *a* é a menor proteína encontrada no veneno de Cvv, caracterizada como um polipeptídeo básico composto de 42 resíduos de aminoácidos, e que apesar do seu pequeno tamanho, é considerada a proteína majoritária representando cerca de 18% da composição protéica total do veneno de Cvv (OWNBY, CAMERON & TU, 1976; CAMERON & TU, 1977; FOX, ELZINGA & TU, 1979). NEDELKOV & BIEBER (1997) isolaram os dois isômeros da miotoxina *a*, ambos com mesma massa molecular e com pontos isoelétricos (*pI*s) de 10,50 e 10,57, diferindo da miotoxina *a* que apresenta um *pI* de 9,6 (CAMERON & TU, 1977). Além destas, GRIFFIN & AIRD (1990) descreveram também a presença de uma miotoxina composta de 45 resíduos de aminoácidos de peso molecular de 5,04 kDa. No veneno de Cvv, além destas miotoxinas de baixo peso molecular, também foi isolada uma proteína ácida, de 115 kDa, *pI* de 4,8, com atividade hemorrágica, hemolítica, proteolítica e miotóxica, a qual foi denominada viriditoxina (FABIANO & TU, 1981).

As PLA<sub>2</sub> miotóxicas isoladas de venenos de serpentes têm grande similaridade na estrutura primária da enzima, mas apresentam uma grande diversidade de propriedades farmacológicas. Algumas apresentam potentes atividades neurotóxicas, tais como a crotoxina (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984) e a taipoxina (HARRIS & MALTIN, 1982), isoladas da *Crotalus durissus terrificus* e *Oxyuranus scutellatus*, respectivamente. Há PLA<sub>2</sub> miotóxicas que não exibem neurotoxicidade, mas apresentam atividade catalítica, tais como a miotoxina III, isolada de *Bothrops asper* (BULTRON, GUTIÉRREZ & THELESTAM, 1993). Outros membros deste grupo são miotoxinas que apresentam a estrutura de PLA<sub>2</sub>, mas que ou não têm ou que apresentam uma baixíssima atividade catalítica, como, por exemplo, a miotoxina II também isolada de *B. asper* (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989). A PLA<sub>2</sub> isolada de Cvv é uma miotoxina básica, de 14 kDa, com atividade fosfolipásica e não neurotóxica. As células musculares são rapidamente afetadas por esta miotoxina, e as alterações morfológicas iniciais são a lise da membrana plasmática e a formação de lesões do tipo delta (OWNBY, COLBERG & WHITE, 1997). Estas alterações foram completamente inibidas com o inibidor específico *p*-BPB, indicando que uma atividade catalítica deve estar envolvida na miotoxicidade apresentada por esta PLA<sub>2</sub>.

As desintegrinas são proteínas encontradas no veneno de serpentes e que reconhecem proteínas receptoras nas superfícies celulares (integrinas); exibem forte atividade de inibição de agregação plaquetária, e são moduladores das funções dos neutrófilos (revisto em VARON & SPECTRE, 2009). Em 1993, SCARBOROUGH e

cols., identificaram uma desintegrina no veneno de Cvv que denominaram de viridina, possuindo 71 resíduos de aminoácidos na sua composição. Dois anos depois, LIU, PENG & HUANG, (1995) isolaram e identificaram uma proteína do tipo desintegrina crotavirina, com massa molecular de 9,2 kDa e 82 resíduos de aminoácidos, e que apresenta um forte efeito inibitório (dose-dependente) sobre a agregação de plaquetas humanas. No entanto, não fica claro se seriam a mesma proteína, uma vez que não houve uma identificação pela massa molecular da viridina e a composição dos aminoácidos também pouco variou. MACKESSY (2010) indica a existência de apenas uma desintegrina no veneno de Cvv, com massa molecular de 6931,5 Da, a qual especula ser a viridina descrita por SCARBOROUGH e cols. (1993), e não cita a crotavirina por LIU, PENG & HUANG (1995).

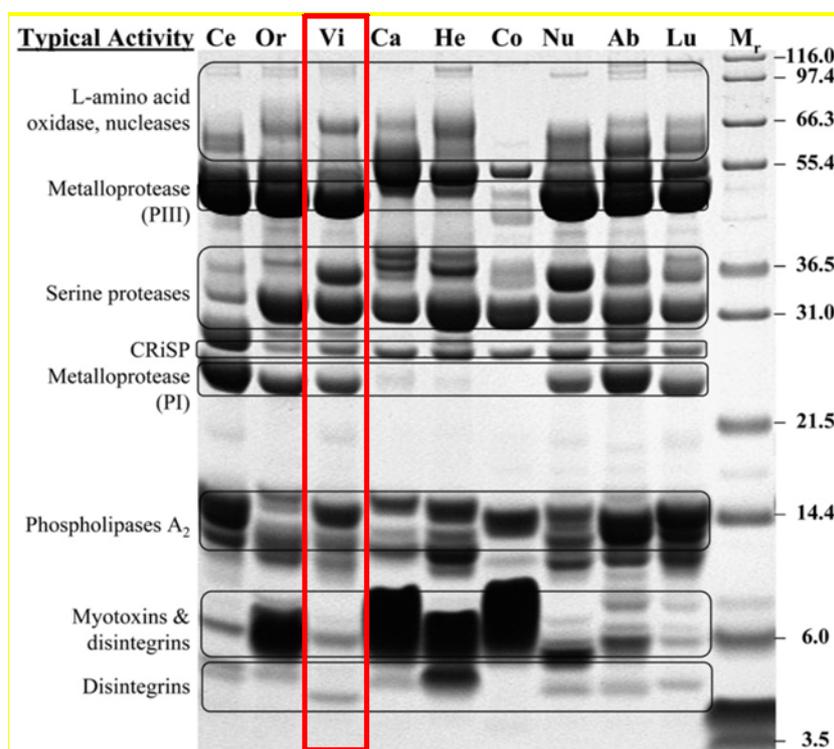
Além das proteínas citadas acima com efeitos hemorrágicos presentes no veneno de Cvv, LI, COLBERG & OWNBY (1993) purificaram e identificaram duas glicoproteínas caracterizadas como metaloproteinases de alto peso molecular, com 68 (p/ 8,5) e 62 kDa (p/ 4,1), que exibiram forte atividade hemorrágica. No ano seguinte, KOMORI, NIKAI & SUGIHARA (1994) também isolaram uma metaloproteinase de peso molecular de 54 kDa com 471 resíduos de aminoácidos, altamente hemorrágica. KOMORI, NIKAI & SUGIHARA (1988) também identificaram uma enzima do tipo calicreína de 32 kDa no veneno de Cvv. Enzimas deste tipo presentes nos venenos liberam quininas, substâncias farmacologicamente ativas que, juntamente com outras substâncias, induzem hipotensão, aumento da permeabilidade vascular e a contração da musculatura lisa visceral, pela liberação de bradicina. Com efeito contrário ao das enzimas do tipo calicreína, GRAHAM e cols. (2005) caracterizaram, a partir do veneno de 30 diferentes espécies de serpentes da família viperidae, incluindo Cvv, uma nova categoria de peptídeos inibidores de bradicinina (BIP). Todos estes apresentam baixa massa molecular (em torno de 10,6 kDa) e inibem consideravelmente as respostas fisiológicas (vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa) induzidas pela presença da bradicina.

WERMELINGER e cols. (2005), buscaram caracterizar peptídeos de baixo peso molecular ainda não descritos em diversos venenos, incluindo o de Cvv, por técnicas relacionadas a espectrometria de massas. Todos os peptídeos seqüenciados pertenciam à família dos BPPs. No veneno de Cvv foram identificados três peptídeos ainda não descritos, com massas de 10,63, 11,16 e 11,65 kDa.

Uma outra família de enzimas também tem sido recentemente descrita em venenos de serpentes, com uma ampla variação de atividade entre diferentes populações de Cvv (AIRD, 2008). As dipeptidil peptidases IV (DPP IV) são serino-proteinases altamente glicosiladas para as quais as células de mamíferos

desempenham diversos papéis importantes, como, por exemplo, a ativação ou inativação de peptídeos biologicamente ativos pela remoção de um peptídeo N-terminal (fenômenos cruciais para regulação dos sistemas imune e endócrinos). Altos níveis de DPP IV também são encontrados nos capilares sanguíneos, sugerindo uma ação local na regulação da pressão sanguínea. A hipótese para a presença destas enzimas nos venenos de serpentes é a que estas desempenhariam um papel neutralizador das respostas hipertensivas resultantes do envenenamento de uma presa pela destruição dos hormônios peptídicos hipertensivos (AIRD, 2008).

Apesar de terem sido identificados alguns dos componentes do veneno de Cvv, muitos ainda são desconhecidos. MACKESSY (2010) realizou um estudo evolutivo da composição dos venenos de cascavéis (*Crotalus viridis sensu lato*), por meio de técnicas de espectrometria de massas e eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 11). O autor indica a presença de diversas proteínas ainda não isoladas no veneno de Cvv e com atividade biológica determinada, como *L*-aminoácido oxidases, metaloproteínas de baixo e alto peso molecular, e proteínas secretadas ricas em resíduos de cisteína (CRiSPs). Desta forma, muito ainda há por se estudar nos venenos de serpentes.



**Figura 11:** Gel de SDS-PAGE mostrando a complexa composição dos venenos de algumas *Crotalus* sp., em destaque para a composição do veneno de Cvv (representada pela sigla Vi, em vermelho). Adaptada de MACKESSY (2010).

## II. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, descrita por Carlos Chagas (1909), é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afetando aproximadamente 16-18 milhões de pessoas nas Américas Central e do Sul. O controle do parasito envolve (i) a eliminação do inseto vetor hematófago, (ii) a melhoria das moradias; (iii) controle dos órgãos destinados a transplantes; (iv) seleção rigorosa do sangue destinado a transfusões; e (v) pasteurização de alimentos que possam conter amostras do inseto vetor e do protozoário. O tratamento dos pacientes é baseado no uso das drogas Nifurtimox e Benznidazole. Devido à diferença de susceptibilidade das cepas do *T. cruzi*, os resultados obtidos por estes fármacos variam com a fase da doença em que são aplicados, o período de tratamento, a dose, idade e origem geográfica dos pacientes. A maior limitação destas drogas na clínica é a baixa atividade na fase crônica da doença, pois além da eficiência terapêutica ser de difícil monitoramento, os sérios efeitos colaterais fazem em alguns casos o tratamento ser abandonado. Apesar de ser uma doença que tem se tornado um problema de saúde pública global em função da alta migração de pessoas de países endêmicos para países “desenvolvidos” não endêmicos, e que por isso não realizam triagem para o *T. cruzi* em bancos de sangue e órgãos destinados a doação, ela afeta principalmente pessoas de baixa renda, e assim não são vistas como mercados-alvo pela indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas drogas. Assim, cabe aos laboratórios de pesquisa de países endêmicos investirem na busca por novos quimioterápicos que sejam empregados em todas as fases da doença e mais seletivos, minimizando os efeitos colaterais.

Fármacos oriundos de fontes naturais são um campo de interesse na área de pesquisa acadêmica e farmacêutica. Diversos compostos têm sido desenvolvidos pela indústria oriundos de plantas e toxinas animais, como por exemplo, o Captopril, medicamento utilizado no controle da hipertensão arterial, derivado de um peptídeo presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Dentro deste contexto, esta tese visou avaliar os efeitos do veneno da serpente *Crotalus viridis viridis* e moléculas isoladas do mesmo, sobre a morfologia, proliferação e infectividade do *T. cruzi*, tentando identificar as organelas-alvo, mecanismos de ação e os seus efeitos na interação com o hospedeiro, além de caracterizar as frações componentes que apresentaram atividade tripanocida.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo Geral

Esta tese visou analisar o efeito do extrato total e frações do veneno da cobra *Crotalus viridis viridis*, sobre a proliferação e a morfologia do tripanosomatídeo *Trypanosoma cruzi*.

#### 2. Objetivos específicos

- Investigar a ação tripanocida do veneno bruto de Cvv sobre as formas tripomastigotas de cultivo e epimastigotas do *T. cruzi*.
- Identificar as alterações morfológicas em parasitos tratados com o veneno de Cvv e frações com atividade tripanocida, e as possíveis organelas-alvo das ações dos compostos, por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo;
- Verificar o efeito do veneno bruto *in vitro*, em culturas de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas e tratadas com diferentes concentrações do veneno de Cvv, visando avaliar o potencial de inibição de proliferação das formas amastigotas intracelulares do parasito.
- Isolar e caracterizar bioquimicamente, por cromatografia líquida de alta resolução no modo fase reversa (RP-HPLC), as frações componentes do veneno de Cvv.
- Avaliar a pureza e composição das diferentes frações do veneno de Cvv por SDS-PAGE e quantificar o conteúdo protéico das frações isoladas para serem utilizadas nos ensaios de atividade tripanocida.
- Avaliar a atividade lítica das frações isoladas do veneno de Cvv sobre as formas tripomastigotas de cultivo.
- Caracterizar, através de espectrometria de massas as frações que apresentaram atividade tripanocida e analisar os espectros MS/MS de cada amostra quanto à similaridade com a estrutura primária de proteínas previamente isoladas e caracterizadas, utilizando os programas MASCOT MS/MS Ion Search e BLAST Network Service do NCBI.

- Analisar, em modelos experimentais de células musculares isoladas, as possíveis atividades miotóxicas da proteína purificada “catrina-like”, através da determinação da atividade de creatino quinase (CK) liberada dos músculos tratados com a proteína.

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Parasitos**

Foram utilizadas as formas tripomastigotas e epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos clones CL-Brener (ZINGALES *et al.*, 1977) e Dm28C (CONTRERAS *et al.*, 1985). Formas epimastigotas foram mantidas a 28°C em meio de cultivo axênico Liver Infusion Tryptose (LIT) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques semanais (CAMARGO, 1964). Estes parasitos foram sempre obtidos de culturas na fase exponencial de crescimento (4º dia) para a execução dos ensaios experimentais. Formas tripomastigotas de cultivo celular foram obtidas do sobrenadante de células LLC-MK<sub>2</sub> previamente infectadas, mantidas com meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 2% de SFB (BISAGGIO *et al.*, 2006).

### **2. Culturas de células**

Células LLC-MK<sub>2</sub> foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup>, mantidas em meio RPMI suplementado com SFB 10% a 37°C em atmosfera contendo CO<sub>2</sub> 5%. A manutenção dessas células foi realizada através de repiques periódicos.

### **3. Veneno**

O extrato total do veneno da cobra *Crotalus viridis viridis* (chamado aqui pela abreviação Cvv) utilizado foi adquirido da empresa Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA), diluído em solução salina tamponada (PBS) estéril (pH 7, 2) e conservado a -20°C, em solução estoque de 50 mg/ ml.

### **4. Avaliação do efeito direto do veneno de Cvv e frações isoladas**

#### **4.1. Efeito direto do extrato total do veneno de Cvv sobre epimastigotas e tripomastigotas**

Formas epimastigotas (Dm28C e CL-Brener) foram ressuspensas em meio LIT em um inóculo de  $5 \times 10^6$  céls/ml, e uma alíquota desta suspensão foi

adicionada ao mesmo volume do veneno, previamente diluído com o dobro da concentração final desejada (0,25 a 500 µg/ml) em placa de 24 poços (Nunc Inc., Naperville, IL, EUA), e incubadas por 120 horas a 28°C. O n° de parasitos foi determinado a cada dia pela contagem dos mesmos em câmara de Neubauer. O parâmetro usado para estimar a inibição da proliferação foi o DL<sub>50</sub>, o que corresponde à concentração de droga necessária para inibir 50% do crescimento celular. Parasitos crescidos sob as mesmas condições foram cultivados em meio LIT na ausência de veneno e usados como controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e em 5 ensaios independentes. A viabilidade dos parasitos foi monitorada baseada na mobilidade e pela detecção da exclusão do azul de trypan pela microscopia de luz, onde uma suspensão de parasitos em seus respectivos meios (10 µl) foi diluída em solução aquosa de 0,4% de azul de Tripán em uma razão de 1:1 de volume, e monitorados pela contagem direta dos parasitos viáveis ou não usando uma câmara de Neubauer.

Tripomastigotas de cultura (Dm28C e CL-Brener) foram ressuspensos na concentração de  $1 \times 10^7$  céls/ml em meio RPMI suplementado com SFB 10%. Esta suspensão (100 µl) foi adicionada em microplacas de 96 poços (Nunc Inc., Naperville, IL, EUA), junto com igual volume do veneno diluído no dobro da concentração final desejada (as mesmas usadas para o tratamento das formas epimastigotas), também diluídos em meio RPMI suplementado com SFB 10%, seguido por incubação a 37°C por 24 horas. O parâmetro DL<sub>50</sub> (50% de lise dos tripomastigotas) foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer após o período de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e em pelo menos três ensaios independentes.

#### **4.2. Efeito direto das frações isoladas do veneno de Cvv sobre formas tripomastigotas durante o “screening” pós HPLC**

No intuito de se avaliar a possível atividade de todas as frações coletadas no item 13.1 (chegando a um total de 60 obtidas na 3ª corrida cromatográfica), as concentrações iniciais de teste foram 0,3, 1,2, 4,8 e 19,2 µg/ml, partindo-se do valor de DL<sub>50</sub> para o tratamento destas formas com o veneno de Cvv bruto. Tripomastigotas de cultura (clone CL-Brener) foram tratados como descrito no

item anterior e o parâmetro DL<sub>50</sub> foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer após o período de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e em pelo menos três ensaios independentes.

#### **4.3. Efeito direto da fração isolada do veneno de Cvv referente à proteína “catrina-like” sobre formas tripomastigotas**

A atividade da fração isolada e caracterizada pela espectrometria de massas referente à proteína “catrina-like” (item 13.5) foi avaliada como descrito anteriormente. As concentrações de teste foram 0,3, 0,6, 1,2, 2,4, 4,8, 9,6, 19,2 e 38,4 µg/ml, partindo-se do valor de DL<sub>50</sub> para o tratamento destas formas com o veneno de Cvv bruto. Tripomastigotas de cultura (clone CL-Brener) foram tratados como descrito anteriormente e o parâmetro DL<sub>50</sub> foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer após o período de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e em pelo menos três ensaios independentes.

#### **5. Efeito direto do veneno de Cvv previamente fervido no crescimento de formas epimastigotas**

O veneno de Cvv foi fervido por 7,5, 15 e 30 minutos a 95°C (previamente descrito por FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 1994) e usado no tratamento de formas epimastigotas (clone CL-Brener). Formas epimastigotas ( $5 \times 10^6$  cels/ ml) foram ressuspensas em meio LIT acrescido de SFB 10% e incubadas por 24, 48 e 72 h a 28°C, com 0,5 µg/ ml do veneno de Cvv previamente fervido. Parasitos também foram mantidos sob as mesmas condições apenas em meio LIT na ausência de veneno (controle negativo) e também na presença de 0,5 µg/ ml do veneno de Cvv não fervido (controle positivo). O n° de parasitos foi determinado por contagem diária em câmara de Neubauer como descrito acima.

#### **6. Avaliação do potencial citotóxico do veneno de Cvv sobre células LLC-MK<sub>2</sub>**

Células LLC-MK<sub>2</sub> não infectadas foram primeiramente submetidas ao tratamento com o veneno de Cvv visando avaliar a sua toxicidade às células

hospedeiras. Estas células foram adicionadas sobre lamínulas redondas previamente aderidas ao fundo de poços de placas de 24 poços, cultivadas em meio RPMI suplementado com SFB 10% e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h (BISSAGIO, ADADE & SOUTO-PADRÓN, 2008). Após este período, as culturas foram lavadas com PBS para a remoção de células não aderidas, cultivadas em meio RPMI acrescido de SFB 2% e tratadas ou não (células controle) com 0,1, 10, 100 e 1000 µg/ml do veneno de Cvv por até 120 h. O meio foi mudado a cada 48 h. As lamínulas foram diariamente coletadas, lavadas em PBS, fixadas com solução de Bouin, coradas com Giemsa e aderidas a lâminas de vidro com Permout (Fisher Scientific, Nova Jersey, EUA). Foram analisados o n° de células aderidas e os aspectos morfológicos das mesmas.

Em paralelo, o mesmo procedimento foi realizado e analisado pelo teste de exclusão do azul de Tripán. Lamínulas foram coradas com uma diluição de 1:1 em volume de solução de azul de trypan: meio RPMI e observadas em microscópio de luz invertido Zeiss Axiovert (Oberkochen, Alemanha).

## **7. Avaliação da atividade do veneno de Cvv sobre o ciclo intracelular do *T. cruzi* em células hospedeiras.**

Para investigar o efeito do veneno de Cvv no ciclo intracelular do parasito, células LLC-MK<sub>2</sub> foram adicionadas sobre lamínulas previamente aderidas em placas de 24 poços como descrito acima. As culturas foram então lavadas e infectadas com formas tripomastigotas de cultura (razão 10 parasitos por célula). Após um período de 24 h de interação, os parasitos não internalizados foram removidos das culturas por repetidas lavagens com PBS e as células então cultivadas em meio RPMI suplementado com SFB 2% na presença (37,5- 500 ng/ ml) ou ausência do veneno de Cvv (células controle). O meio foi mudado a cada 48 h. As lamínulas foram coletadas diariamente por até 96 h, lavadas em PBS, fixadas em solução de Bouin, coradas com Giemsa e aderidas a lâminas de vidro com Permout. A infecção parasitária foi quantificada com o auxílio de um microscópio de luz Zeiss Axioplan 2 (Oberkochen, Alemanha) equipado com a câmera digital Color View XS. O percentual de células infectadas, o n° de amastigotas por célula infectada e por 100 células foi determinado por contagem de um total de 500 células por

lamínula em pelo menos três experimentos independentes. O LD<sub>50</sub> foi estimado como a dose que reduziu em 50% o número de amastigotas por célula infectada.

#### **8. Avaliação da capacidade de infecção e progressão do ciclo intracelular de formas Tripomastigotas Diferenciados na presença de Veneno (TDVs)**

Ao longo dos ensaios descritos no item anterior, alguns tripomastigotas foram liberados no sobrenadante das culturas em tratamento. Estes, nomeados Tripomastigotas Diferenciados na presença de Veneno (TDVs), foram separados dos restos celulares, de amastigotas e parasitos não viáveis do sobrenadante pela centrifugação a 500 x g por 5 min. e mantidos a 37°C por 30 min. Durante este período, TDVs viáveis se moveram do “pellet” para o meio do sobrenadante, o qual foi então coletado e centrifugado a 3000 x g por 12 min. O “pellet” obtido desta centrifugação contendo os TDVs foram monitorados baseados em sua motilidade e pelo teste de exclusão do azul de Tripán pela microscopia de luz, como descrito anteriormente. Os TDVs viáveis foram então ressuspensos em meio RPMI e utilizados na infecção de novas culturas de células LLC-MK<sub>2</sub> (previamente estabelecidas como descrito acima) na ausência do veneno, para avaliar a sua infectividade, em uma razão de 10 TDVs por célula. As células foram cultivadas por mais 4- 5 dias em meio RPMI contendo SFB 2% a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle, células LLC-MK<sub>2</sub> foram infectadas com tripomastigotas de culturas não tratadas com o veneno de Cvv sob as mesmas condições descritas para os TDVs. Após repetidas lavagens com PBS, as lamínulas tanto do controle quanto das interações, e que foram coletadas diariamente, foram fixadas e coradas como descrito previamente. O n° de amastigotas intracelulares por célula infectada e por 100 células foi determinado pela contagem de um total de 500 células por lamínula, em pelo menos três experimentos independentes.

#### **9. Determinação da atividade de PLA<sub>2</sub> através do ensaio turbidimétrico adaptado de Marinetti (1965)**

A atividade da PLA<sub>2</sub> foi determinada pelo ensaio turbidimétrico adaptado descrito previamente por MARINETTI (1965). A PLA<sub>2</sub> na presença de fosfolípídeos da gema do ovo libera quantidades equimolares de

lisofosfolipídeos e ácidos graxos. O substrato foi preparado pela mistura de uma gema de ovo em uma solução de NaCl (150 mM) em um volume final de 100 ml, e estocado a 4°C até o seu uso na reação. Em cada medida, foram preparados diversos tubos com volume final de 0,33 ml de uma solução contendo o 10% de substrato em NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, ácido taurocólico 0,01% e Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 até que a absorvância espectrométrica atingisse 0,62 e 0,65 nm. Durante o procedimento, os tubos foram mantidos a 37°C sob leve e constante agitação. As reações foram iniciadas pela adição do veneno de Cvv na faixa de concentração de 0,05- 10 µg/ml. A especificidade do procedimento foi controlada pela adição de *para*-bromo-fenacil-brometo (*p*-BPB; Sigma), um inibidor específico da PLA<sub>2</sub> (OWNBY, COLBERG & WHITE, 1997; MELO & OWNBY, 1999), utilizado em concentrações de 100- 500 µM. Ambos os testes foram realizados visando abranger a dose do veneno de Cvv correspondente ao DL<sub>50</sub> usada no desafio das formas tripomastigotas. A solução estoque de *p*-BPB (500 mM) foi feita em dimetilsulfóxido (DMSO).

#### **10. Desafio das formas tripomastigotas pelo veneno de Cvv previamente inibido com *p*BPB.**

Tripomastigotas (clone CL-Brener) foram tratados com 0,15, 0,3 e 0,6 µg/ml do veneno previamente incubado por 30 min., à temperatura ambiente, com *p*-BPB 500 µM, de acordo com protocolo previamente descrito por MELO & OWNBY (1999), por 24h a 37°C. Ao mesmo tempo, parasitos também foram tratados com as mesmas concentrações do veneno bruto sem a prévia inibição pelo *p*-BPB. Três tipos de células controle foram utilizadas na ausência do veneno de Cvv: (i) parasitos incubados apenas em meio RPMI suplementado com SFB 10%; (ii) parasitos incubados em meio RPMI suplementado com SFB 10% com DMSO (a concentração final deste não excedeu 0,1% da razão vol/vol e não apresentou efeito de lise sobre as células); e (iii) parasitos incubados em meio RPMI suplementado com SFB 10% apenas com *p*-BPB. O n° de parasitos vivos foi determinado pela contagem de tripomastigotas em câmara de Neubauer e foram realizados três experimentos independentes.

## **11. Análise das alterações morfológicas**

### **11.1. Análise por microscopia eletrônica de varredura**

Epimastigotas e tripomastigotas foram tratados com 0,5 e 0,3 µg/ml do veneno de Cvv por 24 h, respectivamente, lavados duas vezes em PBS e fixados por 1 h em glutaraldeído (GA) a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2) acrescido de CaCl<sub>2</sub> 5 mM e sacarose 2%. Os parasitos foram então lavados no mesmo tampão e aderidos a lamínulas de vidro previamente recobertas com poli-L-lisina 0,1% (P.M. 70.000, Sigma) em PBS. Após 15 minutos de pós-fixação em OsO<sub>4</sub> a 1% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), contendo ferrocianeto de potássio 0,8% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM, as amostras foram lavadas, desidratadas em série crescente de etanol e posteriormente pelo método do ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido no aparelho Balzers CDP-20. As lamínulas foram montadas em suporte de alumínio (“stubs”) e metalizadas com uma fina camada de ouro de 20 nm de espessura pelo método de “sputtering” no aparelho BAL-TEC CPD030. As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5310 (Tóquio, Japão) operado a 25 kV. As imagens digitais adquiridas foram armazenadas para posterior utilização.

### **11.2. Análise por microscopia eletrônica de transmissão**

Epimastigotas e tripomastigotas tratados com 0,5 e 0,3 µg/ml do veneno de Cvv, respectivamente, por 1, 4 e 24 h, e tripomastigotas tratados com 0,93 µg/ml da proteína “catrina-like” por 1, 2 e 24 h foram lavados e fixados como descrito anteriormente. Culturas de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas ou não, e tratadas ou não, aderidas a garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, também foram lavadas em PBS e fixadas como descrito acima, ainda aderidas. As células foram então gentilmente removidas com o uso de uma espátula de silicone (“rubber policeman”), e as células em suspensão foram então coletadas e concentradas por centrifugação. Parasitos e células foram então lavados no mesmo tampão e pós-fixados em OsO<sub>4</sub> a 1% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), contendo ferrocianeto de potássio 0,8% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM, por 1h à temperatura ambiente e protegidos da incidência de luz. As amostras foram lavadas, desidratadas em concentrações crescentes de acetona, impregnadas em resina epoxi Polybed 812 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) e polimerizadas por 72 horas em

estufa a 60°C. Seções ultra-finas obtidas em ultramicrotomo Leica (Nussloch, Alemanha) foram contrastadas com solução aquosa de acetato de uranila 5% por 30 minutos e solução de citrato de chumbo durante 5 minutos ao abrigo de luz, à temperatura ambiente. As análises foram feitas pela observação no microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni 268 (Eindhoven, Holanda), operando a 80 kV.

## **12. Análise por citometria de fluxo**

Formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura (clone CL-Brener) ( $1 \times 10^6$  parasitos/ml) foram tratadas com 0,5- 4,0 e 0,15-1,8  $\mu\text{g/ml}$  de veneno de Cvv, por 24h, a 28°C e 37°C, respectivamente. Os parasitos então foram marcados com **(a)** iodeto de propídio (IP) 15  $\mu\text{g/ml}$ , corante que não atravessa membranas intactas, e desta forma, não se intercala com os ácidos nucléicos dos parasitos evidenciando a integridade da membrana plasmática dos mesmos (MENNA-BARRETO *et al.*, 2008), e **(b)** rodamina 123 (Rh123) 10  $\mu\text{g/ml}$ , composto catiônico que detecta alterações no potencial transmembrana mitocondrial (MENNA-BARRETO *et al.*, 2008), por 15 min, a 28°C e 37°C, respectivamente. As células foram mantidas refrigeradas e na ausência de luz até a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), equipado com o software Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, EUA). Foram coletados 10.000 eventos em região previamente estabelecida correspondente às populações parasitárias. As fluorescências de Rh123 e IP foram captadas, em escala logarítmica, pelos seus respectivos filtros (FL-1: 530-25 nm e FL-3: acima de 670 nm). Diferenças na intensidade de fluorescência da Rh123 entre parasitos tratados e não tratados foram quantificados usando o índice arbitrário de variação (IV) obtido pela equação  $(MT - MC) / MC$ , onde MT e MC correspondem às medianas das fluorescências dos parasitos tratados e dos controles, respectivamente. Valores de IV negativos correspondem à despolarização de membrana mitocondrial. Os dados foram obtidos de pelo menos 3 experimentos independentes.

## **13. Caracterização bioquímica do veneno de Cvv**

### **13.1. Fracionamento por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em coluna analítica de fase reversa C8**

Uma amostra de 10 mg do extrato bruto do veneno de Cvv foi dissolvida em 1 ml de tampão composto de ácido trifluoracético 0,1% (TFA) em água, previamente filtrado em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ , e centrifugada a 2.000g por 2 minutos para a eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi aplicado em coluna analítica de fase reversa C8 (Kromasil, Bohus, Suécia) utilizando um sistema RP-HPLC (Shimadzu, Japão). A coluna foi pré-equilibrada com o mesmo tampão de dissolução do veneno. Foram aplicadas 100  $\mu\text{l}$  de amostra e as cromatografias executadas em temperatura ambiente com um fluxo de 0,7 a 1 ml/ min e monitoradas pela absorbância a 280 nm. As frações retidas na resina da coluna foram eluídas com um gradiente de TFA 0,1% em acetonitrila. As frações foram coletadas e reunidas de acordo com o perfil protéico obtido no cromatograma, concentradas em SpeedVac Concentrator (Savant SPD111V, Thermo Scientific) até a completa remoção do tampão de eluição e ressuspendidas em água destilada estéril.

### **13.2. Dosagem de proteína**

A concentração de proteína das frações do veneno foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando solução de soroalbumina bovina (BSA) na concentração de 1 mg/ml para construção da curva-padrão e 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie Blue-G a 0,025%, etanol a 11,75% e ácido fosfórico a 21,25%) e 50  $\mu\text{l}$  de PBS pH 7,2. Os ensaios foram realizados em placa de 96 poços utilizando um volume de 10  $\mu\text{l}$  de amostra para um volume final de reação de 200  $\mu\text{l}$ . A leitura foi realizada, após 10 min. de contato dos sistemas reacionais com o corante, em leitor de ELISA SpectraMax M2 (Molecular Devices) sob o comprimento de onda de 562 nm.

### **13.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida do veneno de Cvv bruto e frações obtidas por RP-HPLC**

O perfil eletroforético do veneno bruto de Cvv e das frações obtidas por RP-HPLC que apresentarem atividades tripanocidas (no item 4.2), foi determinado em gel de poliacrilamida segundo protocolo descrito por LAEMMLI

(1970). O gel de separação foi preparado na concentração de 16% de acrilamida, SDS 0,1% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. O gel de concentração foi preparado com 5% de acrilamida, SDS 0,1% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e foi utilizado um sistema Mini Protean II Cell (BioRad Laboratories, Califórnia, EUA). As amostras (10 µg/ml) foram diluídas a 1:4 (vol/vol) em tampão de amostra 4 X (glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 1%, β-mercaptoetanol 7% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 100°C, antes da aplicação no gel. A corrida do gel ocorreu em sistema vertical, com tampão de corrida 1X (glicina 19,2 M, SDS 0,1%, Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8) sob uma voltagem constante de 120V à temperatura ambiente. As bandas protéicas foram visualizadas utilizando-se solução corante contendo Coomassie Brilliant Blue R 0,25%, metanol 40% e ácido acético 10% em água destilada. Como descorante foi utilizada uma solução contendo metanol 35% e ácido acético 10% em água destilada. Padrões de proteínas de massas moleculares conhecidas foram utilizados aplicando-se 4 µl do marcador de peso molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas Life Science, Canadá).

#### **13.4. Digestão trípica *in gel* das bandas isoladas correspondes às frações purificadas.**

Os géis de poliacrilamida contendo as bandas referentes às proteínas e peptídeos isolados e que apresentaram atividade tripanocida (item 4.2), foram digeridos para posterior análise por espectrometria de massas (modificado de SHEVCHENKO *et al.*, 1996).

As bandas dos géis foram cortadas e completamente descoradas em 0,5mL de solução acetonitrila 50%/ bicarbonato de amônio 25 mM em água deionizada (pH 8,0). Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetonitrila 100% (2X por 5 min cada), reduzidas em solução ditioneitol (DTT) 10 mM por 60 min, à 56°C, e alquiladas em solução de iodoacetamida (IAA) 50 mM por 45 min, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Removida esta solução, os fragmentos de géis foram lavados em solução de bicarbonato de amônio 100mM por 10 min e novamente desidratados com 100% de acetonitrila (2 X por 5 min cada). Os géis foram reidratados em solução de 100mM bicarbonato de amônio e novamente desidratados em acetonitrila (2 X

por 5 min cada). Evaporada toda a acetonitrila, os géis foram digeridos em solução de tripsina (Gold-Mass Spec Grade, Promega Madison, WI, EUA) em bicarbonato de amônio 50 mM gelado, onde a concentração da enzima era de 20 ng/ $\mu$ l. Este procedimento foi feito por 45 min em banho de gelo. O excesso de solução de tripsina foi removido, e o material foi então incubado por 20h a 37°C em solução bicarbonato de amônio 50 mM. Após este período, as amostras foram extraídas pela adição sequencial de duas soluções de extração (sol. 1: ácido fórmico 5% em água e sol 2: ácido fórmico 5% em solução de acetonitrila 50%), transferidas para tubos ausentes dos fragmentos de géis, concentradas em aparelho Speed Vac<sup>R</sup> plus e armazenadas a -20°C para posterior análise.

### **13.5. Espectrometria de massas**

As amostras extraídas como descrito anteriormente, foram solubilizadas em solução de ácido fórmico 1% e transferidas para tubos específicos para a realização das espectrometrias de massas. O seqüenciamento das proteínas foi conduzido em plataforma cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS) em espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massas híbrido Q-ToF Micro (Waters, Micromass), acoplado a um sistema *on-line* de HPLC nano Acquity (Waters).

Os peptídeos foram separados por coluna Symmetry C18 em tampão A (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 5% em água deionizada) com um gradiente de 50 min do tampão B (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 95% em água deionizada), em fluxo de 0,4  $\mu$ l/ min. O gradiente estabelecido foi: 95%A/ 5%B (0 min.)/ 85%A/ 15%B (1 min.)/ 65%A/ 35%B (35 min.)/ 40%A/ 60%B (40 min.)/ 40%A/ 60%B (44 min.)/ 95%A/ 5%B (45 min.). A ionização por ESI foi realizada com a voltagem da fonte ajustada para 3,5 kV e temperatura do cone a 90°C. Todos os parâmetros foram definidos pelo programa MassLynx v 2.1.

Este modelo de analisadores associados (tandem) do tipo quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF) conta com um sistema Nanolock Spray (Waters, Micromass), que corrige as variações de calibração que ocorrem ao longo do período de aquisição dos espectros de cada amostra. Todas as aquisições foram calibradas com uma solução de ácido fosfórico a 1% em acetonitrila 50%

em água purificada, e adquiridas em fluxo contínuo, onde foram adquiridos 1 espectro de 1 segundo (Inter Scan Time 0,1 s) em frequência de 20 segundos.

As frações purificadas também foram analisadas em ionização a laser assistida por matriz MALDI-TOF Voyager-DE™ PRO (Applied Biosystems) para confirmação da pureza das amostras e confirmação das massas moleculares. As frações foram misturadas com uma matriz de ácido  $\alpha$ -cyano 4-hydroxicinâmico em solução de acetonitrila 50% e TFA1%. Os espectros foram adquiridos no modo refletido com o dispositivo “extração atrasada”, na faixa massa/ carga de 800 a 4000 daltons. As misturas foram aplicadas (1  $\mu$ l) na placa de MALDI e secas à temperatura ambiente. Em seguida, os espectrômetros foram calibrados utilizando como padrão uma mistura comercial de peptídeos de massa conhecida: Calmix1 (Applied Biosystem). As massas dos íons observados correspondiam às massas dos peptídeos obtidos a partir das frações purificadas e detectados no espectrômetro (mapa peptídico).

### **13.6. Análise dos peptídeos por bioinformática**

Os espectros MS/MS gerados pela espectrometria de massas de cada amostra foram avaliados quanto à similaridade de estrutura primária utilizando os programas MASCOT MS/MS Ion Search ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

### **13.7. Identificação das proteínas**

A identificação dos espectros e possíveis similaridades com proteínas previamente isoladas e caracterizadas foi feita automaticamente. O programa MASCOT calculou uma pontuação para cada proteína encontrada a partir da probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório.

## **14. Ensaio em camundongos**

### **14.1. Animais**

Foram utilizados camundongos suíços adultos (25-30g) que receberam água e ração *ad libitum*, mantidos em ciclo de luz natural, para a realização dos ensaios de miotoxicidade e sobre a homeostasia dos composto isolado “catrina-like”, visando o estabelecimento de faixas de concentração limítrofes para futuros ensaios de interação e tratamento *in vivo*. Todos os ensaios com animais foram feitos em acordo

com os padrões de cuidado animal estabelecidos pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CAUAP-UFRJ), da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **14.2. Avaliação da atividade miotóxica *in vitro* da proteína “catrina-like”**

A miotoxicidade *in vitro* foi avaliada pela determinação da atividade de creatino quinase (CK) liberada dos músculos EDL (*extensor digitorum longus*) banhados em solução nutritora, como descrito por MELO & OWNBY (1996). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.

Foram retirados os membros posteriores de cada animal, os músculos EDL cuidadosamente isolados e transferidos para unidades coletoras de amostras de 2,5 ml de capacidade, onde foram perfundidos continuamente à taxa de 2,5 ml/min com solução de Ringer fisiológica (PSS- *Physiological Saline Solution*), equilibrada e com 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> e pH ajustado para 7,40 ± 0,02. A composição do PSS (em mM): NaCl, 135; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 2; NaHCO<sub>3</sub>, 15; NaHPO<sub>4</sub>, 1; glicose, 11. A cada 30 min, as soluções de perfusão foram trocadas por soluções frescas, e as coletadas sendo armazenadas a 4°C até a determinação da atividade de CK, utilizando kit diagnóstico (Sigma Chemical Co).

Às amostras coletadas foi adicionada albumina bovina 0,1% a fim de estabilizar e minimizar a perda da atividade enzimática. A atividade de CK foi expressa em U/l, onde uma unidade é a atividade que caracteriza a transformação de 1 μmol de NAD/ min a 25°C. A atividade de CK liberada pelo músculo isolado foi expressa em unidades de enzimas liberadas no meio, por grama, por hora de coleta (U.g.<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). A liberação basal refere-se à enzima liberada pelos músculos no meio nutritor em condições de repouso, no início dos ensaios, depois da preparação ter sido monitorada nas unidades coletoras de amostras e ter ficado em solução nutritora normal por aproximadamente 1 hora. Em todos os experimentos, a proteína “catrina-like” foi adicionada ao meio nutritor nas concentrações de 0,93 μg/ ml após a coleta da solução controle. Após a coleta das amostras para a análise de CK, os músculos foram removidos das unidades coletoras, limpos de tecido adiposo e tendões, secos em papel de filtro absorvente e pesados.

Para determinar o conteúdo total de CK nos músculos, os músculos EDL banhados somente em PSS foram fragmentados, homogeneizados em 2 ml de PSS e albumina 0,2% e utilizados para determinar a atividade de CK no homogeneizado após diluído 1:10. O conteúdo de CK foi expresso em U.g.<sup>-1</sup>. Em todos os experimentos foram utilizados pares de músculos do mesmo animal, sendo que cada ensaio foi realizado em triplicata.

### **15. Análise estatística**

Os dados quantitativos obtidos a partir dos ensaios com as frações bioquímicas, foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis através do programa BioEstat 2.0 para Windows (Sociedade Civil Mimirauá, Brasília, DF, Brasil). As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## V. RESULTADOS

### 1. Efeito direto do veneno bruto de Cvv

Formas epimastigotas (clones Dm28C e CL-Brener) foram cultivadas por 5 dias em meio LIT contendo diferentes concentrações do veneno de Cvv, e a porcentagem de parasitos vivos foi avaliada (**Tabela 5**). O DL<sub>50</sub> (50% de inibição de crescimento) após 24 h de tratamento foi de  $0,5 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$ , e após 96 e 120 h os valores foram de  $0,9 \pm 0,43$  e  $1 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. O DL<sub>50</sub> para formas tripomastigotas (clones Dm28C e CL-Brener) foi de  $0,3 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$  (**Tabela 5**). Não houve crescimento quando os parasitos foram tratados com 8-500  $\mu\text{g/ml}$  do veneno bruto de Cvv.

**Tabela 5.** Diferentes valores de DL<sub>50</sub> obtidos pelos tratamentos das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas intracelulares do *T. cruzi* com o veneno bruto de Cvv

Dias de tratamento	Epimastigotas	Tripomastigotas	Amastigotas intracelulares <sup>d,e</sup>
1	$0,5 \pm 0,18^a$	$0,3 \pm 0,19^b$	$0,075 \pm 0,01$
2	$0,6 \pm 0,12$	Nr <sup>c</sup>	$0,037 \pm 0,03$
3	$0,7 \pm 0,12$	Nr	$0,029 \pm 0,03$
4	$0,9 \pm 0,43$	Nr	$0,17 \pm 0,02$
5	$1,0 \pm 0,49$	Nr	Nr

<sup>a</sup>Valores de DL<sub>50</sub> expressos em  $\mu\text{g/ml}$

<sup>b</sup>Média  $\pm$  desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em pelo menos três experimentos independentes

<sup>c</sup>Não realizado

<sup>d</sup>Determinado por contagem diária do n° de amastigotas por célula infectada

<sup>e</sup>Parasitos do clone CL-Brener

O DL<sub>50</sub> do tratamento do veneno de Cvv sobre as formas amastigotas intracelulares (**Tabela 5**) foi determinado nos diferentes dias pós-infecção

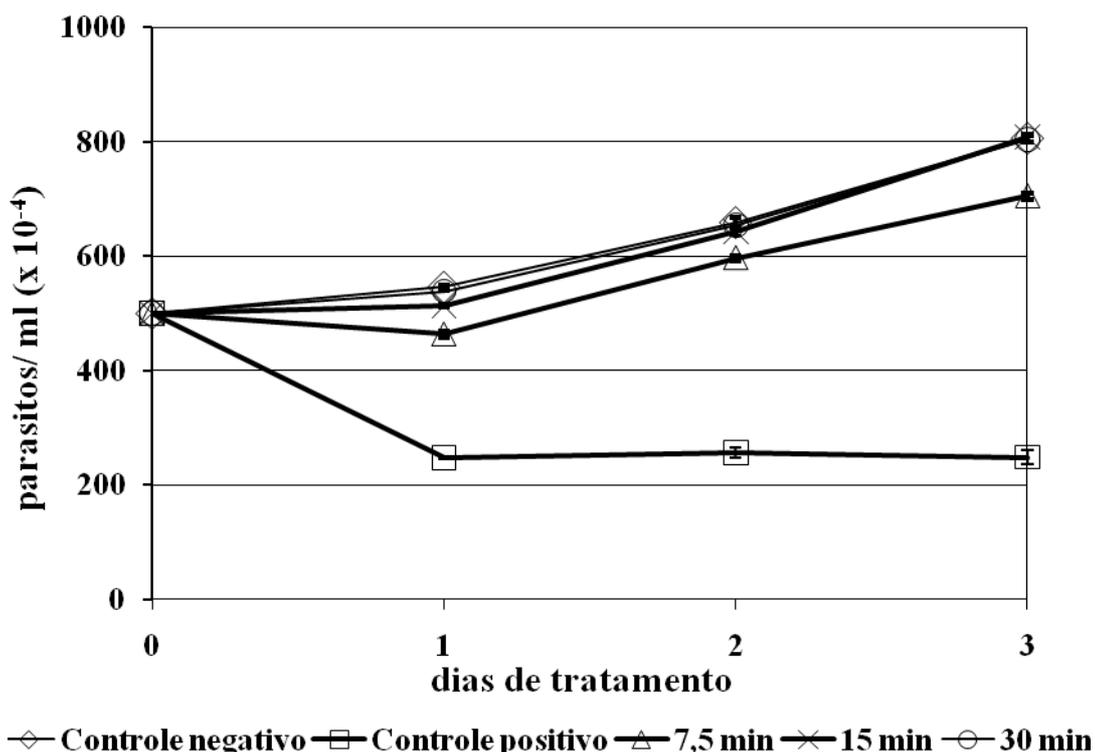
considerando o n° de amastigotas por célula infectada. O DL<sub>50</sub> obtido após 24 h de tratamento foi de 0,075 ± 0.01 µg/ml, o menor valor dentre as três formas morfológicas analisadas.

A perda de viabilidade dos epimastigotas e tripomastigotas foi avaliada pela microscopia de luz através do teste de exclusão do azul de Tripán (não mostrado) e pela citometria de fluxo através da marcação do iodeto de propídio (IP). Formas epimastigotas e tripomastigotas incubadas por 24 h na presença de 0,5 e 0,3 µg/ml do veneno de Cvv, respectivamente, e então marcadas com IP apresentaram cerca de 59% e 43% de células não viáveis, respectivamente. Os valores relativos a esta marcação na presença de diferentes concentrações do veneno estão apresentados na Tabela 6 (apresentada mais à frente).

## **2. Efeito direto do veneno bruto de Cvv previamente fervido**

No intuito de avaliar se a ação do veneno de Cvv contra o *T. cruzi* seria em função da presença de componentes protéicos e enzimas presentes no mesmo ou devido à atividade de outros tipos de compostos (alcalóides e/ou outros componentes orgânicos, por exemplo), o veneno de Cvv foi fervido por diferentes períodos de tempo e usado no tratamento de formas epimastigotas (clone Dm28C), sempre na concentração de 0,5 µg/ml (**Fig. 12**).

A fervura do veneno de Cvv por 7,5 min não foi capaz de abolir completamente a atividade antiproliferativa do mesmo, sendo detectada um efeito inibitório parcial de cerca de 10-14% na proliferação dos parasitos até o 3° dia após o início do tratamento. As demais fervuras aboliram completamente o efeito inibitório de veneno de Cvv, não havendo diferenças entre parasitos incubados apenas em meio LIT e os que foram incubados com o veneno de Cvv por 15 e 30 min.



**Figura 12.** Efeito do veneno de Cvv previamente fervido sobre a proliferação de epimastigotas do *T. cruzi*. Os parasitos foram incubados por até 3 dias, a 28°C, com 0,5 µg/ml do veneno de Cvv previamente fervido por 7,5 (-▲-), 15 (-X-) e 30 (-O-) minutos a 95°C. Todos os tratamentos foram comparados a proliferação dos parasitos em meio LIT na ausência de veneno (-◇- controle negativo) ou na presença de 0,5 µg/ml do veneno de Cvv sem fervura prévia (-□- controle positivo). Valores médios de três experimentos independentes.

### 3. Alterações morfológica geradas pelo veneno de Cvv em formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*

As alterações morfológicas apresentadas nas formas epimastigotas (**Fig. 13**) e tripomastigotas (**Fig. 14**) (ambas pertencentes ao clone CL- Brener) foram observadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 24h de tratamento com 0,5 e 0,3 µg/ml de veneno de Cvv, respectivamente.

A maior parte dos parasitos tratados apresentou inchaço do corpo celular quando comparados aos parasitos não tratados (**Fig. 13B-D, 14B-D**) e ocasionalmente foram observados parasitos com formas completamente alteradas (**Fig. 13C, 14C-D**). Alguns epimastigotas também apresentaram uma intensa torção do corpo celular (**Fig. 13D**). O tratamento também ocasionou o aparecimento de projeções e o rompimento da membrana plasmática em

tripomastigotas tratados, indicando uma desorganização intensa na membrana destes parasitos (**Fig. 14E-H**).

A ultraestrutura dos parasitos tratados foi avaliada pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) (**Fig. 13 e 14**). As alterações mais freqüentes que foram observadas nas formas epimastigotas foram inchaço do corpo celular com uma aparente perda de organização das organelas, vacuolização citoplasmática (**Fig. 13E-H**), inchaço da mitocôndria com alterações nas membranas desta organela e a presença de figuras de mielina (**Fig. 13E, F, H**), e perda de componentes citoplasmáticos (**Fig. 13E, H**). Eventualmente, diversos epimastigotas completamente lisados puderam ser observados. A morfologia do núcleo também apresentou alterações caracterizadas por mudanças no formato e na organização da cromatina, bem como um aparente escape de seu conteúdo (**Fig. 13G**).

Os tripomastigotas tratados com o veneno de Cvv apresentaram um “alargamento” do espaço entre o núcleo e o citoplasma (**Fig. 14F, inset**). As alterações mitocondriais notadas em alguns dos parasitos tratados eram similares às verificadas nas formas epimastigotas (**Fig. 14J**). O veneno também causou uma intensa vacuolização do citoplasma, não permitindo a visualização das estruturas e organelas (**Fig. 14H**). Contudo, na maioria dos tripomastigotas pode-se observar um citoplasma denso com organelas inchadas e “blebs” de membrana projetando-se do corpo celular e das porções de membrana do flagelo. Em alguns destes “blebs”, puderam ser observadas rupturas na estrutura da membrana (**Fig 14F, G, I, J**). Apesar do dano mitocondrial em ambas as formas morfológicas, a integridade da rede de kDNA do cinetoplasto aparentemente não foi alterada (**Fig. 13F, H, 14 G, I**).

O inchaço mitocondrial apresentado pelos parasitos tratados através da MET, fez com que tratássemos ambas as formas do *T. cruzi* com veneno de Cvv por 24 h e os marcássemos com Rh 123 para posterior análise por citometria de fluxo. As análises confirmaram os dados observados na ultraestrutura. Quando epimastigotas e tripomastigotas foram tratados respectivamente com 0,5 e 0,3 µg/ml de veneno de Cvv por 24 h, e então incubados com Rh 123, foi observado um decréscimo na fluorescência, sugerindo uma interferência mediada pelo veneno no potencial próton eletroquímico da membrana da mitocôndria. A redução nos valores das

medianas das fluorescências de epimastigotas e tripomastigotas tratados foi dose-dependente, com valores de IV chegando a -0,76 e -0,34 após o tratamento com os respectivos valores de DL<sub>50</sub> (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Análise por citometria de fluxo do *T. cruzi* tratado com veneno de Cvv e marcado com IP e Rh 123

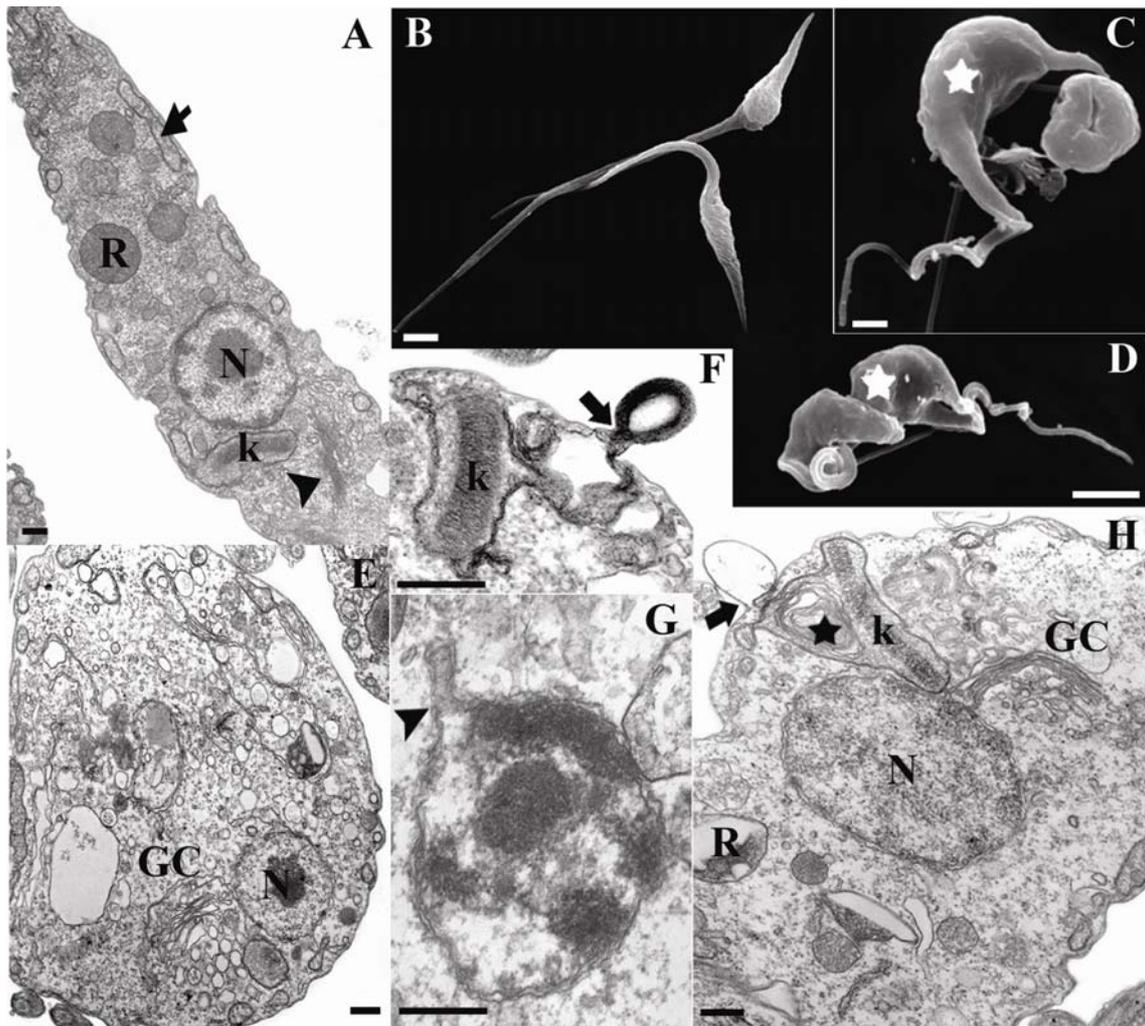
	µg/ml	Mediana Rh123	IV <sup>a</sup>	IP (%) <sup>b</sup>
Epimastigotas	0	280,0 <sup>c</sup> ± 14,2	0,00	0,03 ± 0,01
	0,5	67,3 ± 2,1	-0,76	59,0 ± 0,2
	1,0	64,6 ± 0,9	-0,77	67,2 ± 1,4
	2,0	48,6 ± 1,2	-0,82	89,1 ± 3,3
	4,0	45,3 ± 1,4	-0,84	99,0 ± 0,5
Tripomastigotas	0	50,2 ± 3,8	0,00	1,2 ± 0,24
	0,15	35,1 ± 0,2	-0,30	19,0 ± 3,6
	0,3	32,9 ± 0,7	-0,34	43,2 ± 0,7
	0,9	24,5 ± 0,9	-0,51	68,7 ± 2,5
	1,8	17,6 ± 1,1	-0,65	86,9 ± 3,9

Tratamento de epimastigotas e tripomastigotas (clone CL-Brener) com veneno de Cvv por 1 dia em meio LIT a 28°C e em meio RPMI a 37°C, respectivamente.

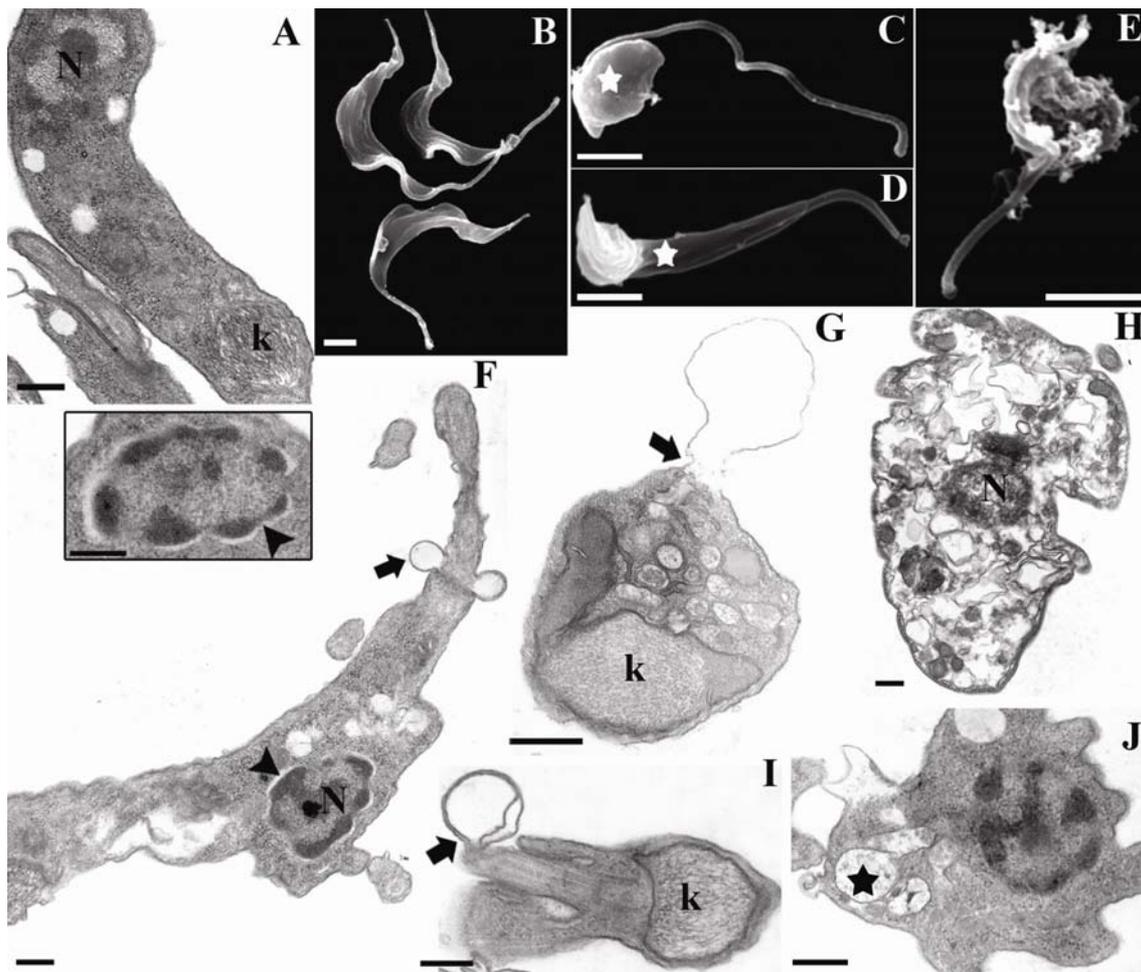
<sup>a</sup> Índice Arbitrário de Variação - IV =  $(MT-MC)/MC$ , onde *MT* e *MC* correspondem às medianas de fluorescência médias de parasitos tratados e controle, respectivamente.

<sup>b</sup> Porcentagem de células IP-positivas.

<sup>c</sup> Dados representados pela média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.



**Figura 13.** Efeito do veneno de Cvv sobre a ultraestrutura de epimastigotas do *T. cruzi* através da microscopia de transmissão (A, E-H) e de varredura (B-D). Os parasitos foram tratados com 0,5  $\mu\text{g/ml}$  do veneno de Cvv por 1 dia. A-B: epimastigotas não tratados, mostrando um corpo celular típico alongado e organelas como núcleo (N), complexo de Golgi (GC) (cabeça de seta em A), cinetoplasto (k), mitocôndria (seta em A) e reservosomos (R); C-D: parasitos tratados apresentando corpo celular inchado e retorcido (estrela branca); E-H: parasitos tratados com desorganização interna. O veneno causou um intenso inchaço de todo o parasito incluindo todas as organelas, com perda de componentes citoplasmáticos (E). Foi observada a presença de “blebs” projetando-se da membrana do corpo celular (seta em F e H). Alterações morfológicas também foram observadas na membrana nuclear (cabeça de seta em G). (H) Alguns reservosomos apresentaram-se alterados e também foram detectadas a ocorrência de figuras de mielina na mitocôndria (estrela). Barras: A, E-G: 300 nm; B-D: 2  $\mu\text{m}$ .

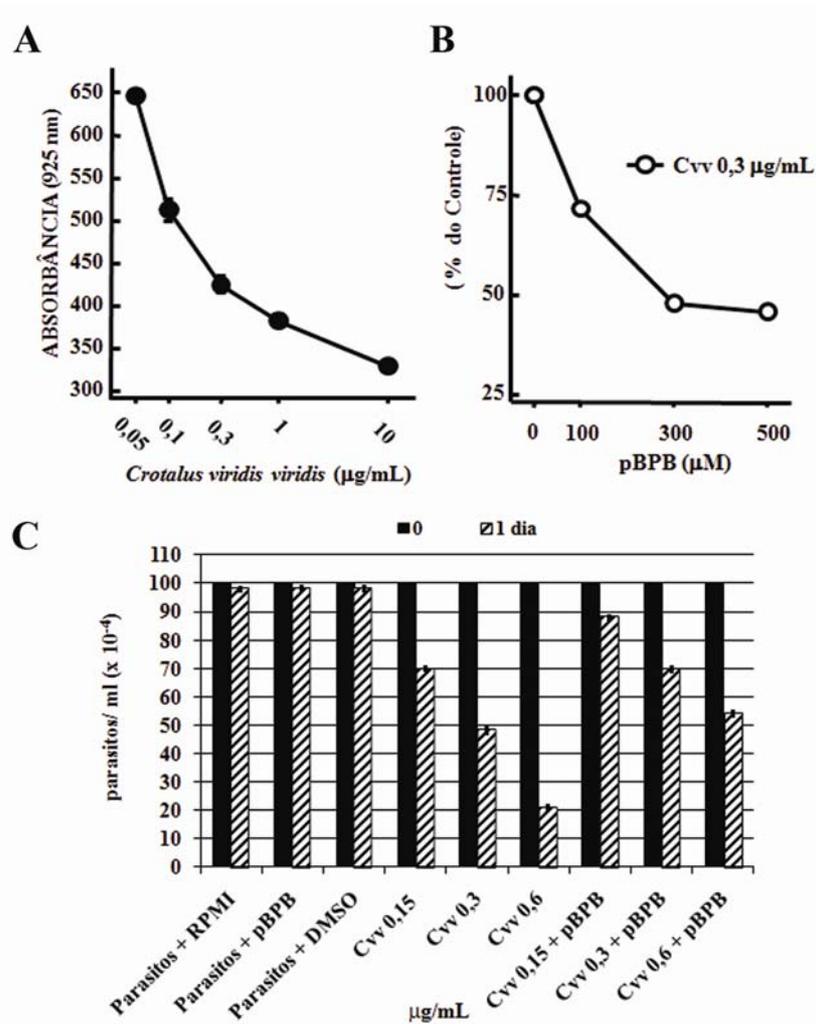


**Figura 14.** Efeito do veneno de Cvv sobre a ultraestrutura de tripomastigotas do *T. cruzi* observados através da microscopia eletrônica de transmissão (A, F-J) e varredura (B-E). Os parasitos foram tratados com 0,3  $\mu\text{g/ml}$  de veneno por 1 dia. (A, B) Parasitos controle apresentando morfologia típica, onde núcleo (N) e cinetoplasto (k) encontram-se com suas características normais. (C-E) Parasitos tratados com corpo celular inchado e retorcido (estrela branca em C e D), perda da integridade de membrana e lise celular (E e H). As principais alterações na ultraestrutura dos tripomastigotas observadas pela MET foram a contração da membrana nuclear (cabeça de seta no inset e em F), a presença de áreas claras no citoplasma, projeção de “blebs” do corpo celular (seta em G) e da membrana do flagelo (setas em F e I), e a presença de organelas inchadas (G). (J) Note uma mitocôndria apresentando inchaço (estrela preta). Barras: A, F-J: 300 nm; B-E: 2  $\mu\text{m}$ .

#### **4. Desafio de formas tripomastigotas pelo veneno de Cvv previamente inibido com *p*-bromofenacil brometo (*p*BPB).**

As alterações morfológicas observadas na membrana citoplasmática e nas organelas dos parasitos tratados nos sugestionou a considerar que estas poderiam ser o alvo ou um dos alvos iniciais de ação do veneno de Cvv. Desta forma, para avaliar a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) presente no veneno bruto, foi realizado o ensaio turbidimétrico adaptado de MARINETTI (1965).

Atividade significativa foi observada no veneno bruto de Cvv nas diferentes concentrações utilizadas ao longo destes ensaios. A absorbância do substrato específico foi reduzida em quase a metade após a adição de 0,1- 19 µg/ml do veneno de Cvv (**Fig. 15A**). A atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> presente em 0,3 µg/ml de veneno foi inibida em mais de 60% na presença de *p*-BPB 500 µM, inibidor específico desta enzima (**Fig. 15B**). O *p*-BPB também mostrou efeito inibitório sobre a atividade lítica do veneno de Cvv sobre as formas tripomastigotas (clone CL-Brener). Parasitos incubados por 24 h na presença de 0,15, 0,3 e 0,6 µg/ml de veneno apresentaram 30, 52 e 80% de lise, respectivamente. Quando estes parasitos foram incubados com veneno previamente inibido com 500 µM de *p*-BPB, a razão de lise ficou entre 12-57% (**Fig. 15C**). Assim, a atividade de PLA<sub>2</sub> presente no veneno bruto, como determinado pela inibição pelo *p*-BPB, pode estar envolvida não apenas na lise do parasito mas também em outros efeitos observados através da microscopia eletrônica.

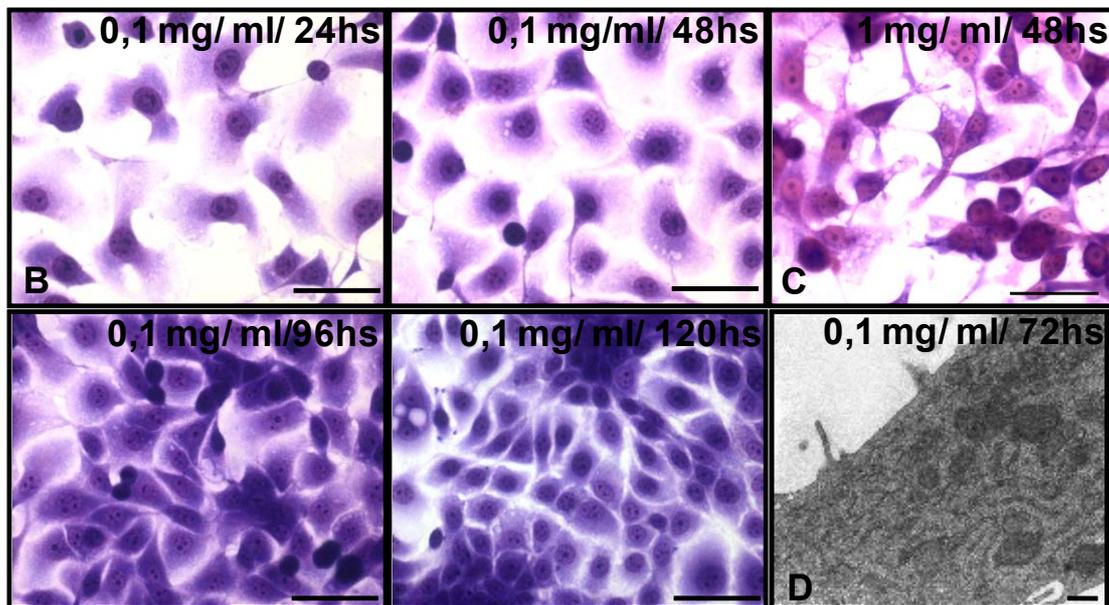
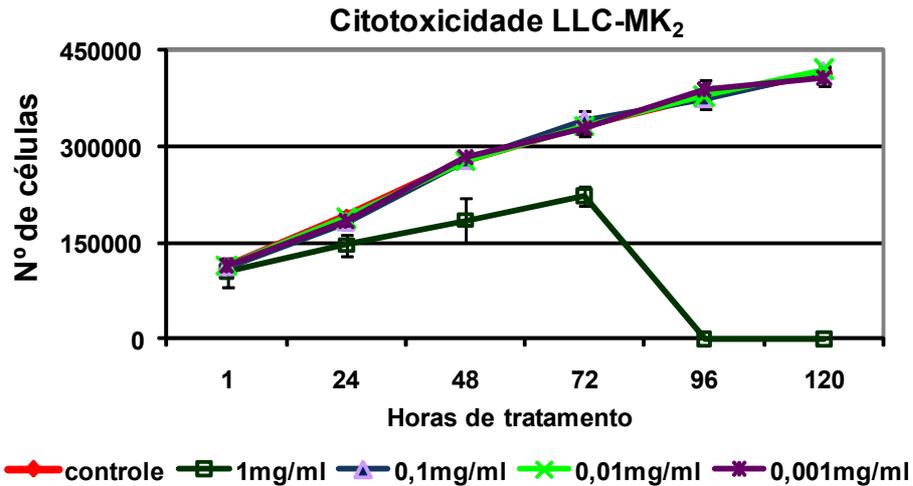


**Figura 15. Atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no veneno bruto de Cvv e sua inibição pelo *para*-Bromo-Fenacil Brometo (*p*BPB). (A) Curva da atividade fosfolipásica do veneno de Cvv (0,05-10 µg/ml) na presença de substrato específico. A atividade enzimática foi medida 30 min após a adição de 0,05-10 µg/ml de veneno à solução de substrato. (B) Efeito do *p*BPB (100-500 µM) sobre a atividade fosfolipásica do veneno de Cvv (0,3 µg/ml). Dados estão expressos como médias ± desvio padrão (n=5). (C) Avaliação da atividade lítica do veneno previamente inibido pelo *p*-BPB sobre formas tripomastigotas (clone CL-Brener). Os parasitos foram incubados por 1 dia em meio RPMI na presença de 0,15, 0,3 e 0,6 µg/ml de veneno de Cvv normal ou incubado com *p*-BPB (500 µM). Foram usados os seguintes controles: (i) parasitos incubados em meio RPMI suplementado com SFB 10% (parasitos + RPMI); (ii) parasitos incubados em meio RPMI contendo DMSO na mesma diluição presente nas soluções finais de *p*-BPB (parasitos + DMSO); (iii) parasitos incubados em meio RPMI com *p*-BPB 500 µM (parasitos + *p*-BPB).**

## **6. Avaliação citotóxica do veneno bruto de Cvv sobre células LLC-MK<sub>2</sub>**

Um importante aspecto da quimioterapia de doenças causadas por parasitos intracelulares é se a droga é capaz de acessar o citoplasma das células hospedeiras e interferir com o crescimento e diferenciação das formas intracelulares. Contudo, é possível que a droga afete diretamente a célula hospedeira, interferindo com a determinação de tais resultados. Desta forma, foram realizados ensaios visando estabelecer uma faixa de concentração do veneno bruto de Cvv passível de ser usada em posteriores ensaios de atividade sobre células hospedeiras infectadas.

Células LLC-MK<sub>2</sub> foram submetidas ao tratamento com 0,001- 1 mg/ml de veneno de Cvv bruto por até 120 h, e processadas para análise sob a microscopia de luz e eletrônica de transmissão (**Fig. 16**). A quantificação da proliferação celular foi feita dia-a-dia a partir de células coradas com Giemsa e analisadas pela microscopia de luz (**Fig. 16A**). Lise, inibição de crescimento e alterações estruturais foram detectadas apenas na concentração de 1 mg/ml já nas primeiras 24 h de tratamento (**Fig. 16A, C**), onde as células apresentavam arredondamento da forma, perda de adesão e intensa vacuolização citoplasmática (**Fig. 16C**). A faixa de concentração 0,001- 0,1 mg/ml não ocasionou diferenças significativas na proliferação das células tratadas em relação as controle (**Fig. 16A**) e nem alterações morfológicas nos diferentes intervalos de tempo (**Figs. 16B, D**). Esta faixa de concentração testada é muito maior que as utilizadas nos ensaios sobre amastigotas intracelulares (**Tabela 5**).

**A**

**Figura 16. Avaliação da toxicidade do veneno bruto de Cvv sobre células LLC-MK<sub>2</sub> por até 120h.** (A) Curva de crescimento das células LLC-MK<sub>2</sub> na presença de 0,001-1 mg/ ml por até 120 h de tratamento. As culturas foram mantidas em meio RPMI suplementado com SFB 2% a 37°C. Note que apenas a concentração de 1 mg/ml se mostrou tóxica as células, havendo total perda de adesão das culturas após 72 h de tratamento. (B). Sequência de imagens que mostram células tratadas com 0,1 mg/ml de veneno de Cvv em diferentes intervalos de tempo e que não apresentam diferenças morfológicas entre si. (C). Células tratadas na concentração de 1 mg/ml apresentando características morfológicas indicativas de toxicidade, como vacuolização citoplasmática e arredondamento da forma. (D). Ultraestrutura típica de célula LLC-MK<sub>2</sub> tratada por 72 h com 0,1 mg/ml do veneno de Cvv, confirmando a não toxicidade desta concentração para as células hospedeiras. Barras: B-C: 50 µm; D: 300 nm.

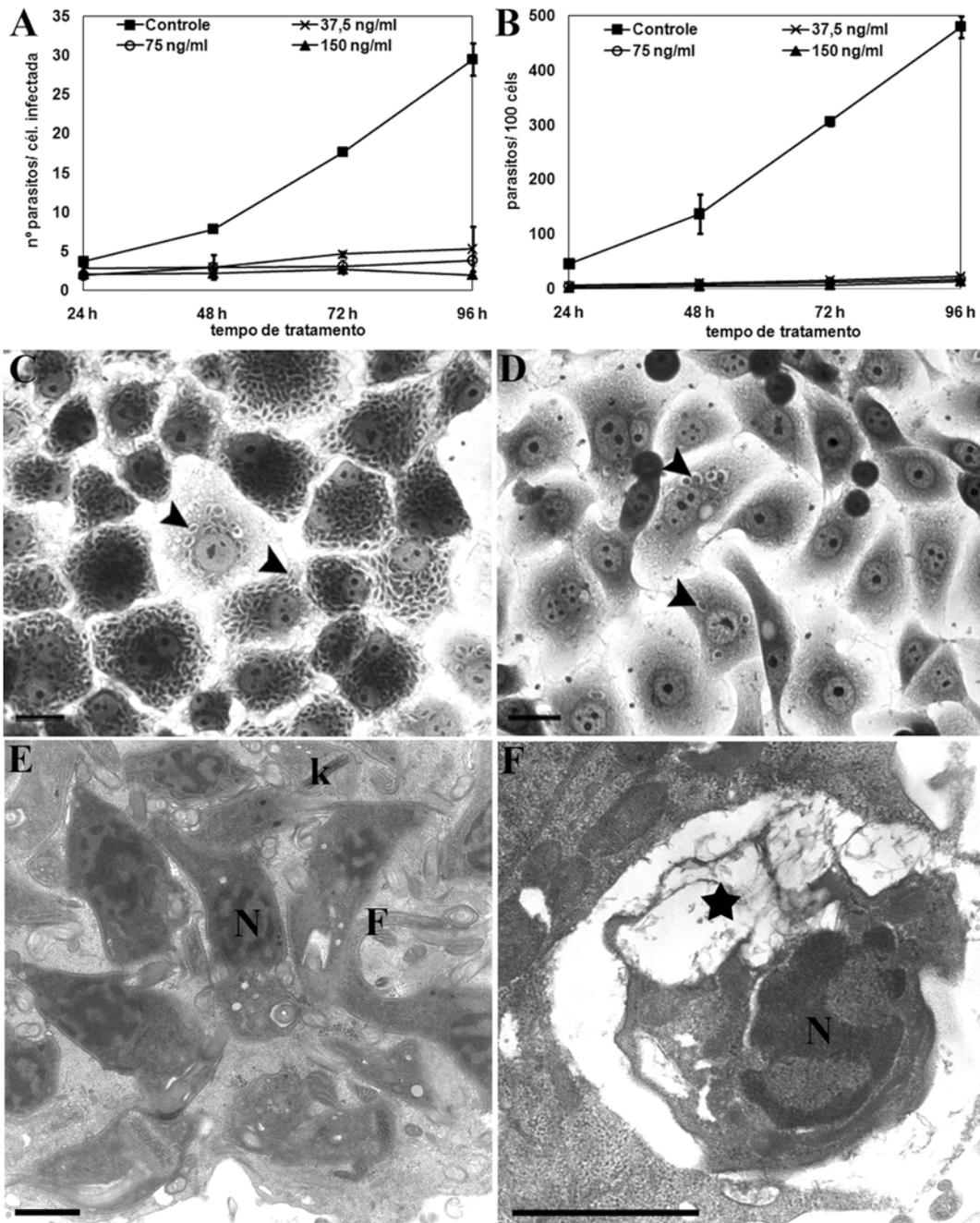
## 7. Avaliação da atividade do veneno bruto de Cvv sobre células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com *T. cruzi*.

A observação de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas e não tratadas através da microscopia de luz demonstrou um aumento progressivo na quantidade de amastigotas intracelulares nos diferentes dias dos experimentos (**Tabela 7 e Fig. 17C**).

Culturas de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com parasitos do clone CL-Brener, e posteriormente tratadas com diferentes doses do veneno de Cvv, mostraram um significativo decréscimo no n° de parasitos por célula infetada (**Fig. 17A**) e no n° de parasitos por 100 células (**Fig. 17B**), quando comparadas às culturas não tratadas. Células infectadas incubadas por 72 h na presença de 37,5 ng/ml do veneno de Cvv apresentaram redução de cerca de 76 e 94% no n° de parasitos por célula infetada e no n° de parasitos por 100 células, respectivamente (**Fig. 17C, D**). A incubação de células infectadas com 150 ng/ml do veneno não apenas inibiu significativamente o crescimento intracelular após 72 h de tratamento, como também causou um considerável decréscimo no n° de parasitos por célula infectada (**Fig. 17A**).

A análise da ultraestrutura dos amastigotas intracelulares após 48 h de tratamento mostrou diferenças significativas na estrutura da célula, quando comparadas às do controle. As células apresentaram vacúolos inchados e lise da membrana celular (**Fig. 17E, F**).

Um grande n° de parasitos livres foi observado apenas no sobrenadante de culturas de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas e tratadas com concentrações menores que 250 ng/ml (**Fig. 17D**) após 48 h de tratamento. As formas morfológicas observadas consistiam de amastigotas, formas intermediárias e tripomastigotas diferenciados na presença do veneno (TDVs). A marcação dos TDVs com o azul de Tripán indicou que 89% destes eram de formas não viáveis, e a análise ultraestrutural (**Fig 18**) mostrou que estes parasitos apresentavam intenso inchaço das diferentes organelas e grande desorganização interna (**Fig. 18B**), mitocôndrias alteradas (**Fig. 18B-C**) e perda de conteúdo nuclear (**Fig. 18C**).



**Figura 17:** Células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas e tratadas com o veneno de CvV. Microscopia de luz (C-D) e eletrônica de transmissão (E-F). (A-B) A infecção das células LLC-MK<sub>2</sub> foi quase abolida após o tratamento com 150 ng/ml do veneno por 4 dias. Um baixo nível de infecção também foi mantido com 37,5 e 75 ng/ml do veneno no mesmo período. (C, E) Células não tratadas após 72 h de infecção evidenciando as altas taxas de infecção, com a presença de muitos amastigotas intracelulares (cabeças de setas). Pela MET, os parasitos intracelulares com típica morfologia do núcleo (N), cinetoplasto (k) e flagelo (F). (D) Células tratadas com 37,5 ng/ml por 48 h apresentaram um baixo nível de infecção, com poucos amastigotas intracelulares (cabeças de setas). As células LLC-MK<sub>2</sub> não apresentaram alterações morfológicas nos 4 dias de tratamento. (F) Os amastigotas intracelulares após 48 h de tratamento com 37,5 ng/ml de veneno apresentaram um intenso inchaço dos compartimentos citoplasmáticos (estrela preta), com ruptura da membrana celular. Barras: C-D: 20  $\mu$ m; E-F: 1  $\mu$ m.

Considerando a possibilidade que até mesmo 10% de parasitos viáveis serem capazes de perpetuar uma infecção, os TDVs (clone CL-Brener) foram

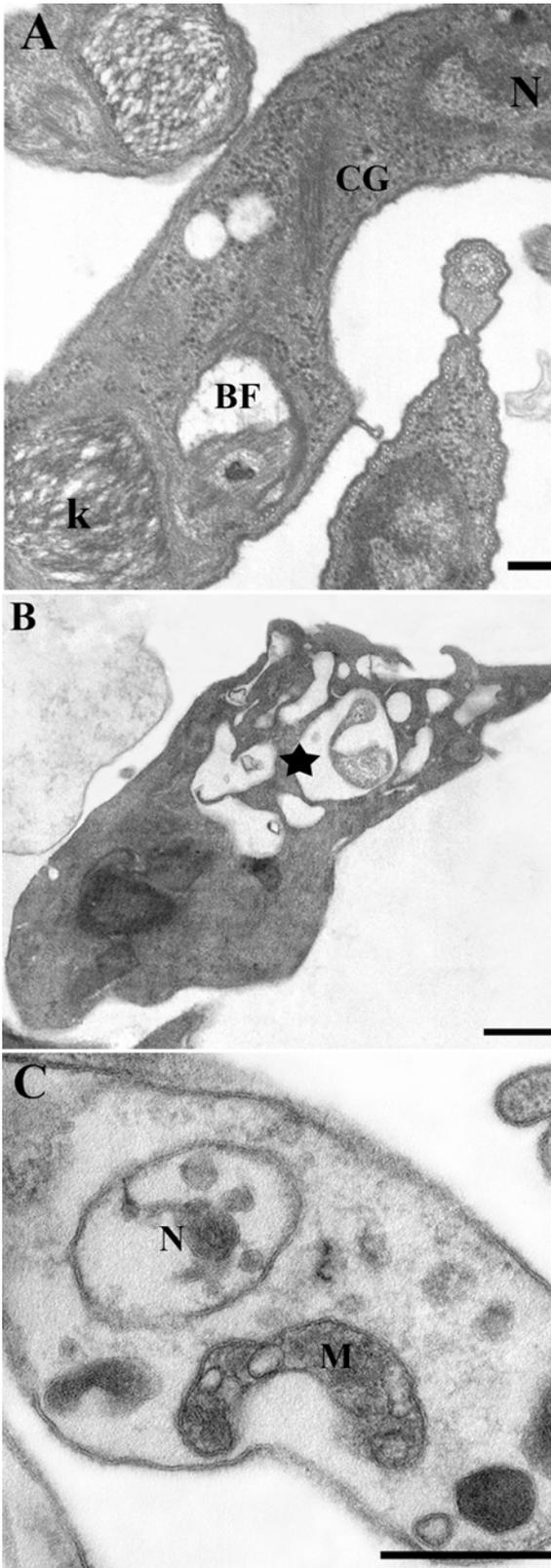
submetidos a uma nova infecção na ausência do veneno. O isolamento dos TDVs viáveis e tripomastigotas controle foi feito a partir de uma centrifugação moderada do meio de cultura, seguida da incubação a 37°C para que as formas viáveis e móveis deixassem o “pellet” e enriquecessem o sobrenadante, de onde eles foram novamente isolados por nova centrifugação.

Houve uma redução progressiva de 63-92% no n° de células infectadas no período de 48-144 h pós-infecção das células LLC-MK<sub>2</sub> (**Tabela 7**). O n° de amastigotas por 100 células também teve uma redução significativa neste mesmo período. Após 48 h de infecção, 15 amastigotas diferenciados a partir da infecção por TDVs foram observados por 100 células LLC-MK<sub>2</sub>, o que representa uma redução de cerca de 74% em relação ao n° de parasitos intracelulares observados em células infectadas com tripomastigotas controle. Após 144h de infecção, foi observada uma redução de 96% (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Evolução da proliferação de amastigotas intracelulares derivados da infecção de células LLC-MK<sub>2</sub> por TDVs.

Horas pós-infecção	Controle % de células infectadas	TDV % de células infectadas	% redução	Controle N° de amas/100 céls	TDV N° de amas/100 céls	% redução
48	27,5 ± 3,2*	9,7 ± 0,5	63,0 ± 2,0	58,4 ± 20,1	15,2 ± 2,5	74,0 ± 4,3
72	29,4 ± 4,8	9,7 ± 0,8	67,1 ± 2,9	71,8 ± 25,1	14,5 ± 2,3	79,7 ± 3,2
96	32,8 ± 9,4	4,4 ± 1,7	86,5 ± 5,3	84,2 ± 32,3	6,4 ± 2,0	92,4 ± 2,3
120	42,4 ± 15,8	3,7 ± 0,4	91,2 ± 1,1	106,8 ± 9,4	5,9 ± 0,2	94,4 ± 0,2
144	43,9 ± 17,0	3,5 ± 0,3	92,0 ± 0,7	114,7 ± 8,5	4,4 ± 0,6	96,1 ± 0,5

\*Média ± desvio padrão. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e em 3 experimentos independentes.

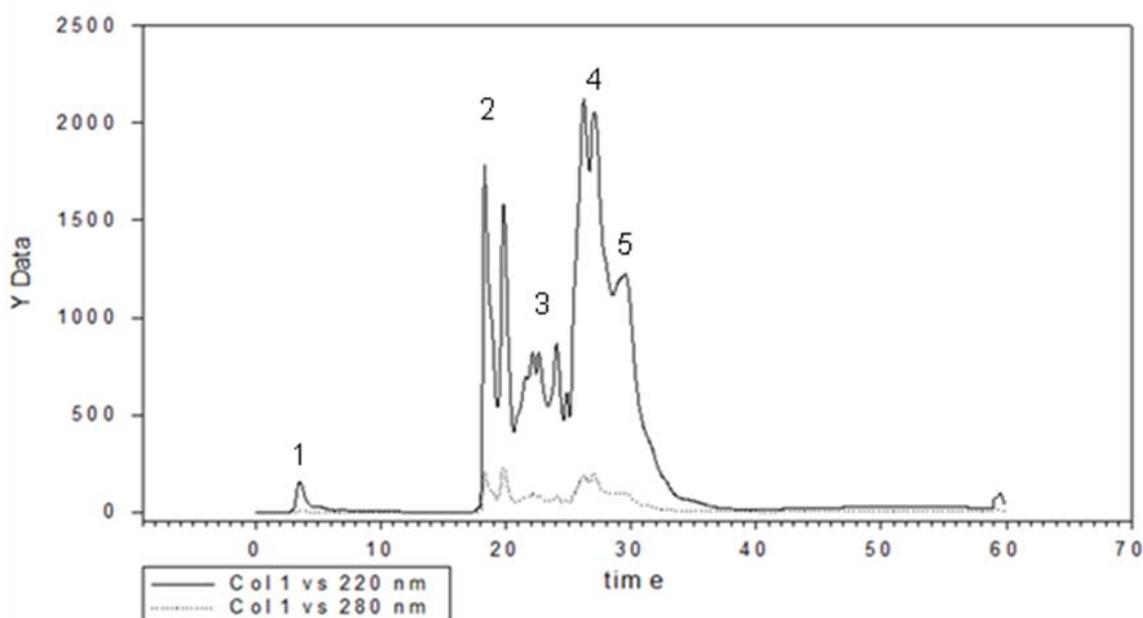


**Figura 18.** Ultraestrutura dos TDVs. A análise através da MET dos TDVs obtidos do sobrenadante de células LLC-MK<sub>2</sub> tratadas com o veneno de Cvv (B-C) mostrou um grande desorganização interna, com muitas organelas inchadas (estrela em B); alterações na organização da cromatina e a perda de conteúdo nuclear, assim como o citoplasmático (C); inchaço mitocondrial e perda de conteúdo da matriz, em comparação ao tripomastigota controle (A). Núcleo (N), mitocôndria (M) Complexo de Golgi (CG), cinetoplasto (k) e bolsa flgelar (BF). Barras: 0,3  $\mu$ m.

## 8. Caracterização bioquímica do veneno de Cvv

No total, foram realizadas 26 corridas cromatográficas em coluna analítica de fase reversa C8 em cromatógrafo de alta resolução (RP-HPLC), com gradientes de eluição distintos, visando uma melhor purificação dos componentes do veneno de Cvv bruto. Todas as amostras eluídas foram previamente concentradas para remoção do tampão orgânico, ressuspendidas em água destilada estéril e então submetidas aos ensaios de atividade.

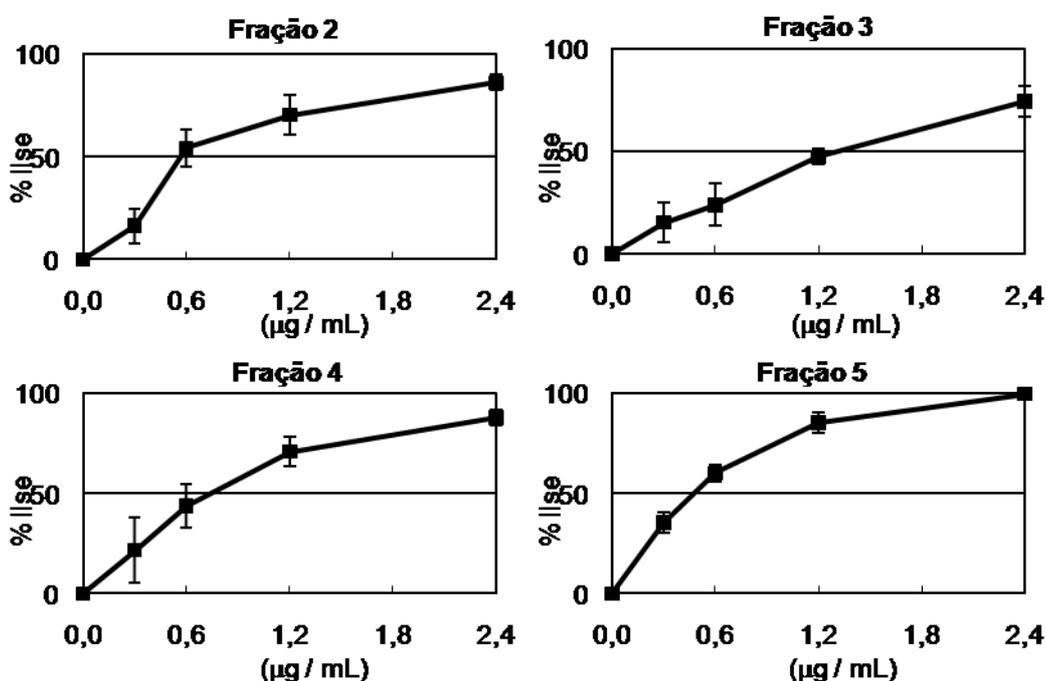
A primeira corrida cromatográfica foi realizada em um fluxo de 0,7 ml/ min e gerou um total de 60 frações eluídas, agrupadas segundo o perfil do cromatograma gerado (**Fig. 19**). Um total de cinco frações foi gerado para os ensaios de atividade sobre as forma tripomastigotas do *T. cruzi*: Fração 1 (tubos 4 e 5); fração 2 (tubos 18 a 20); fração 3 (tubo 21 a 24); fração 4 (tubos 25 a 27); e fração 5 (tubos 28 a 32).



**Figura 19:** 1ª corrida cromatográfica do veneno de Cvv em coluna C8 por RP-HPLC, que resultou em 5 frações para ensaios de atividade sobre tripomastigotas.

Destas 5 frações, apenas a fração 1, correspondente ao primeiro pico (tubos 4 e 5) não apresentou atividade (apenas  $6,9 \pm 3,7$  % de atividade na máxima dose testada) e nem diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p= 0,2482$ ). Todos os ensaios realizados após esta primeira separação

cromatográfica foram feitos com as concentrações de 0,3, 0,6, 1,2 e 2,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . A fração 5 foi a que se mostrou mais ativa, chegando a 100% de lise após 24 h de tratamento com 2,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Fig. 20), apresentando um  $\text{DL}_{50}$  de  $0,48 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . As demais frações apresentaram, em ordem crescente de concentração de  $\text{DL}_{50}$ , de  $0,57 \pm 0,19$  (fração 2),  $0,75 \pm 0,58$  (fração 4) e  $1,33 \pm 0,64$  (fração 3)  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Apesar dos diferentes valores de  $\text{DL}_{50}$  e porcentuais de lise apresentados pelas frações 2-5, apenas as de n° 3 e 5 apresentaram diferença estatística significativa entre si ( $p < 0,05$ ), as demais frações apresentaram diferenças apenas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

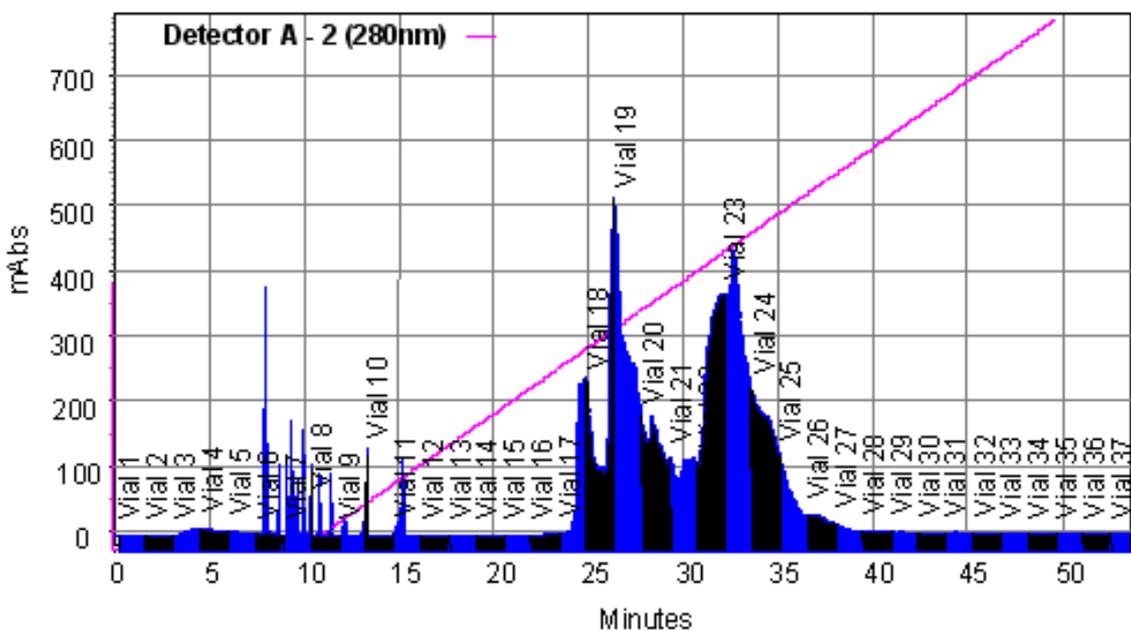


**Figura 20:** Atividade de lise das frações 2-5 obtidas a partir da primeira corrida cromatográfica, onde a fração n° 5 apresentou a menor concentração necessária para lisar os tripomastigotas após 24 h de tratamento. Houve diferença significativa apenas entre as frações 3 e 5 ( $p < 0,05$ ).

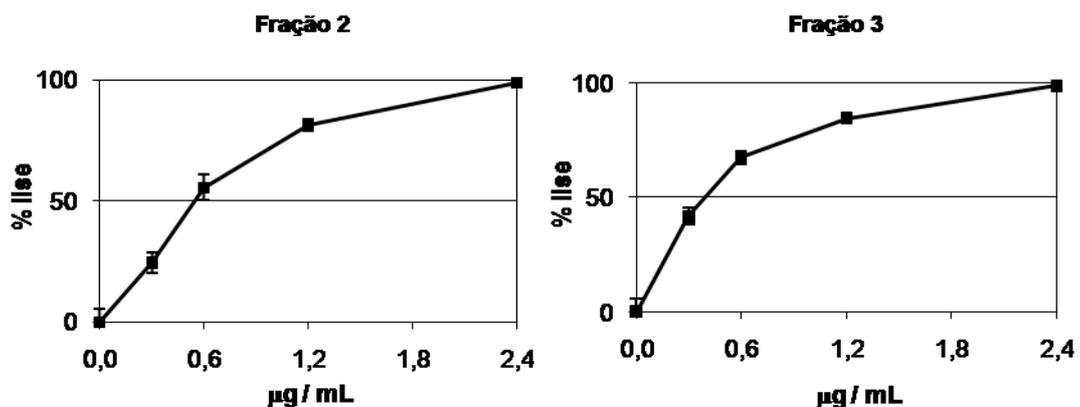
Em função dos dados obtidos com o primeiro fracionamento, foi executada uma segunda corrida cromatográfica, também realizada em um fluxo de 0,7 ml/min e que gerou um total de 50 frações eluídas e agrupadas segundo o perfil do cromatograma gerado (Fig. 21).

Foram geradas um total de 3 frações para avaliação da atividade: Fração 1 (apenas o tubo 17), fração 2 (tubos 18 a 21) e fração 3 (tubos 22 a

26). Destas, a fração 1 apresentou uma incipiente atividade de cerca de  $12 \pm 8,8$  % de lise após tratamento com  $2,4 \mu\text{g}/\text{ml}$  por 24 h de incubação, mas que, no entanto, difere estatisticamente em relação ao grupo controle ( $p= 0,0209$ ). O tratamento com as frações 2 e 3 chegou a 100% de lise com a mesma dose e o mesmo período, com valores de  $\text{DL}_{50}$  de  $0,54 \pm 0,13$  e  $0,40 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente (**Fig. 22**). O tratamento com estas duas frações não apresentou diferença estatística significativa entre elas em relação ao percentual de lise, apenas em relação ao grupo de parasitos não tratados ( $p<0,05$ ).



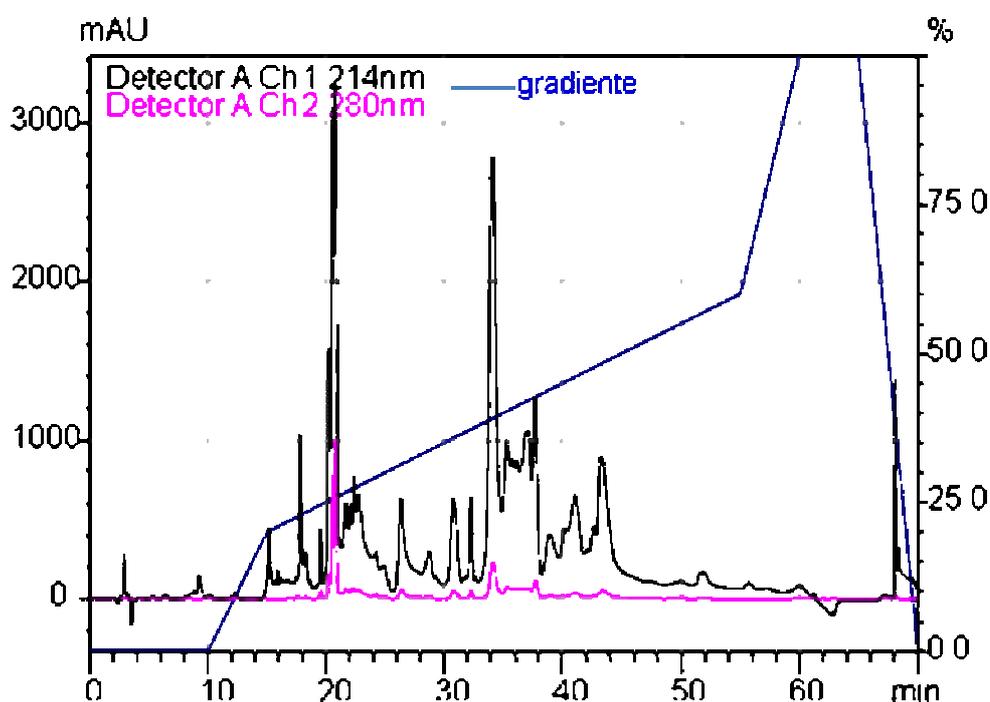
**Figura 21:** Cromatograma referente ao segundo fracionamento do veneno de Cvv por RP-HPLC, onde foram testadas 3 frações totais referentes aos “vials” 17 a 26.



**Figura 22:** Atividade de lise das frações 2 e 3 obtidas após o segundo fracionamento do veneno de Cvv. Não houve diferença significativa entre o tratamento com ambas as frações

( $p=0,7728$ ), apenas com relação ao controle ( $p<0,05$ ).

Buscando uma melhor separação dos picos apresentados nos cromatogramas e conseqüentemente, dos componentes do veneno de Cvv, o gradiente de corrida do tampão B (TFA 0,1% em acetonitrila) em função do tempo foi novamente alterado. Desta cromatografia foram geradas 60 frações que foram testadas isoladamente, não havendo, portanto, nenhum agrupamento como nas duas separações ocorridas anteriormente (**Fig. 23**). A corrida cromatográfica foi realizada em um fluxo de 1 ml/ min.



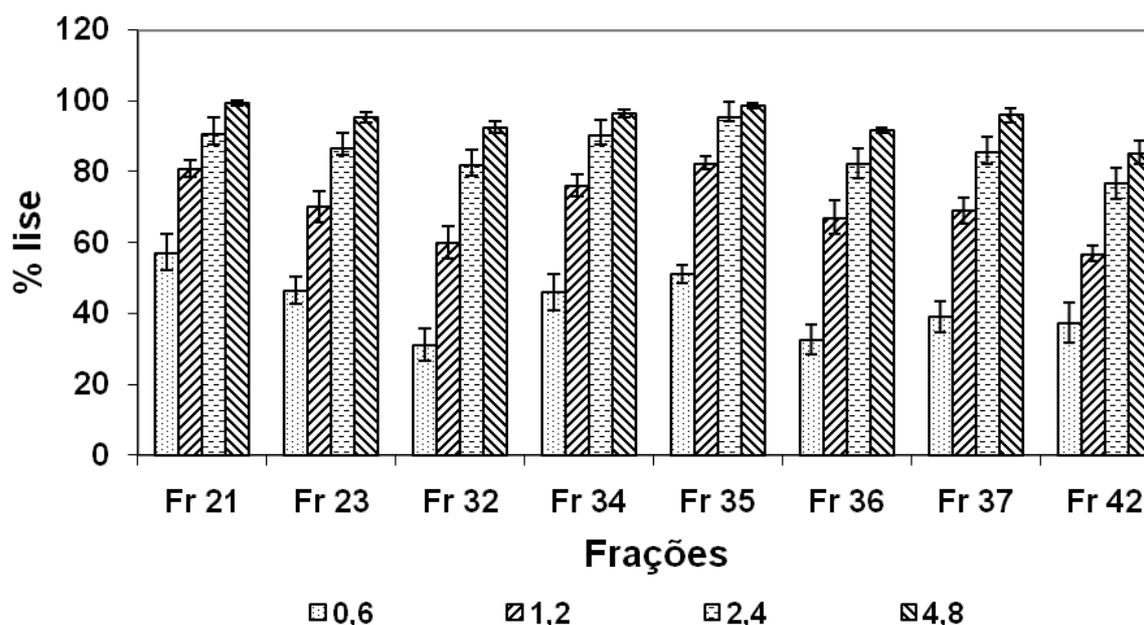
**Figura 23:** Cromatograma referente ao terceiro fracionamento do veneno de Cvv, onde pode ser observada uma melhor separação dos picos.

Como nos ensaios anteriores, as concentrações de  $DL_{50}$  que apresentaram atividades tripanocidas se iniciaram em  $0,48 \mu\text{g}/\text{ml}$ , e as frações testadas eram compostas de picos cromatográficos agrupados, ou seja, sem isolados puros, o processo de avaliação de atividade de todas as 60 frações foi otimizado pela faixa de concentração de  $0,6$  a  $4,8 \mu\text{g}/\text{ml}$  de cada fração.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram detectadas oito frações (as de nº 21, 23, 32, 34, 35, 36, 37 e 42) com atividade tripanocida. Destas, as que se mostraram mais ativas após 24 h de tratamento foram as de

n° 21 (DL<sub>50</sub> de 0,5 ± 0,13 µg/ ml) e 35 (DL<sub>50</sub> de 0,55 ± 0,09 µg/ ml), cujos percentuais de lise atingiram 99,4 ± 0,6 e 98,6 ± 1,3 % com a concentração de 4,8 µg/ ml (**Fig. 24**). As frações 23 e 34 apresentaram os mesmos valores de DL<sub>50</sub> (0,65 µg/ ml) e atividades líticas muito similares (**Fig. 24**) onde os valores máximos atingidos foram de 95,43 ± 1,5 e 96,5 ± 1,1 %, respectivamente.

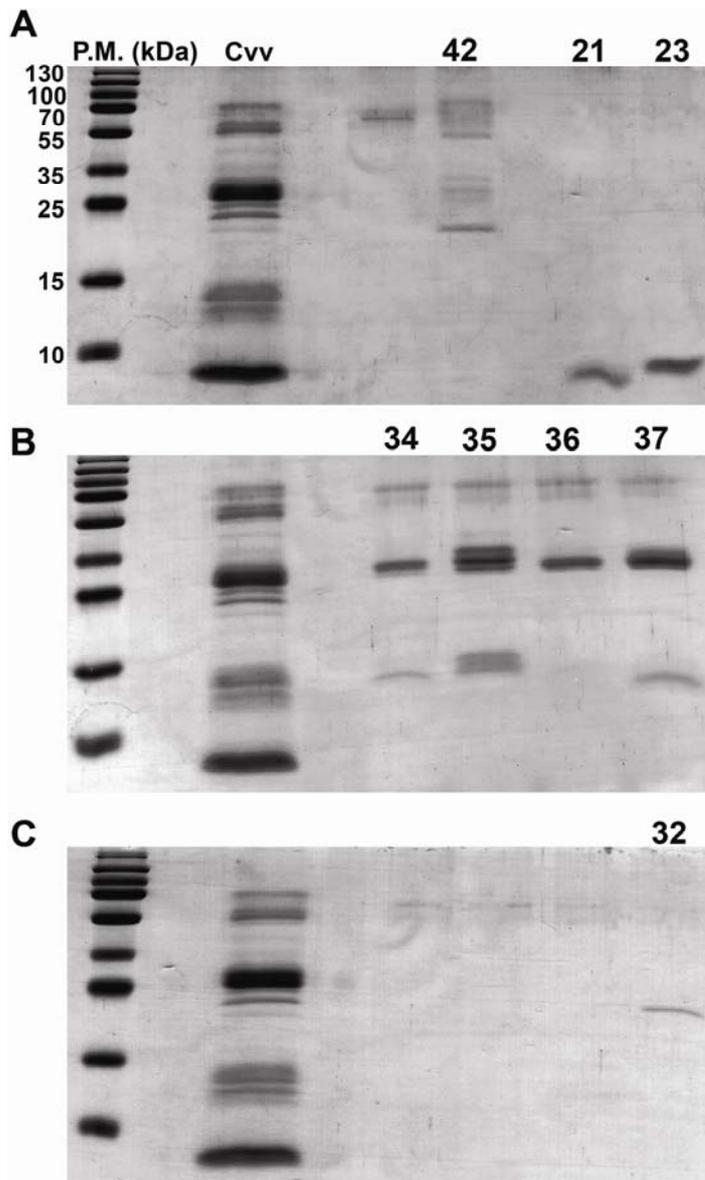
Em ordem crescente de DL<sub>50</sub>, as frações 36 e 37 apresentaram valores de concentração para lise de 50% dos parasitos de 0,8 ± 0,12 e 0,88 ± 0,09 µg/ ml, seguidas pelas frações 32 e 42, as quais ambas apresentaram a concentração de 0,95 ± 0,23 µg/ ml. Estas duas últimas e a fração 36 foram as que exibiram menor percentual de lise sob o tratamento com a máxima concentração, atingindo 92,6 ± 1,7, 85,3 ± 3,3 e 91,7 ± 0,9 %, respectivamente (**Fig. 24**). Apesar das diferenças entre os valores percentuais de lise de tripomastigotas e de DL<sub>50</sub>, apresentados por cada uma dessas oito frações, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos com as frações 23 e 34 com relação às demais frações e entre as mesmas (p>0,05); para estas duas frações, houve diferença estatística apenas em relação ao grupo dos parasitos não tratados (p<0,05). O tratamento com a fração 21 diferiu estatisticamente (p<0,05) com relação ao tratamento realizado com as frações de n° 32, 36 e 42; e os percentuais de lise apresentados pela fração 35 diferiram estatisticamente com relação aos obtidos pelas frações de n° 32, 36 e 42.



**Figura 24:** Porcentual de lise apresentada pelas 8 frações que exibiram atividade tripanocida após 24 h de tratamento nas concentrações de 0,6 a 4,8 µg/ml. Apenas não houve diferença significativa entre os tratamentos das frações 23 e 34 com relação as demais frações e entre si ( $p > 0,05$ ).

A partir dos dados quantitativos apresentados, o grau de pureza destas oito frações foi determinado a partir do perfil eletroforético das mesmas por SDS-PAGE. As frações 21, 23 (**Fig. 25A**) e 32 (**Fig. 25B**) apresentaram-se aparentemente como bandas únicas e com pesos moleculares aproximados de 10,9, 10,5 e 24,1 kDa, respectivamente.

As frações 34, 35, 36 e 37 (**Fig. 25B**) e a de nº 42 (**Fig. 25A**) revelaram-se compostas de porções não completamente fracionadas do veneno de Cvv. Todas elas apresentaram-se como misturas compostas majoritariamente de proteínas de alto peso molecular, que variavam entre 35 e 91 kDa. No entanto, as frações 34, 35 e 37, ainda apresentaram bandas de menor massa, de 14 a 16 kDa, aproximadamente. Algumas destas, poderiam equivaler a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) de 14 kDa, descrita por OWNBY, COLBERG & WHITE, (1997) neste veneno.



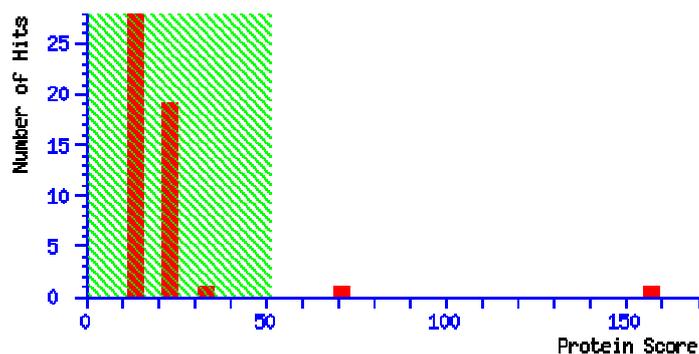
**Figura 25:** SDS-PAGE das oito frações que exibiram atividade tripanocida. **(A)** As frações 21 e 23 se apresentaram como bandas únicas de aproximadamente 10,9 e 10,5 kDa, respectivamente. **(B)** As frações 34 a 37 apresentaram-se compostas de proteínas de diversos pesos moleculares, bem como a fração 42. **(C)** A fração 32 também apresentou-se como fragmento único, com peso molecular aproximado de 24,1 kDa. P.M. refere-se ao padrão de peso molecular aplicado no gel.

A quantidade *per se* de diferentes proteínas presentes nas frações 34 a 37 poderiam justificar as altas razões de lise, principalmente da fração 35 que, pela análise em SDS-PAGE, é a que mais apresenta componentes protéicos. Porém, as frações 21, 23 e 32 também apresentaram alta capacidade tripanocida e, pelo mesmo tipo de análise, apresentaram-se como isolados puros. Somado a isso, ainda tem o fato de que a fração 21 foi, juntamente com a fração 35, a de menor valor de  $DL_{50}$  após 24 h de tratamento, e a de maior porcentual de lise na concentração de 4,8  $\mu\text{g/ml}$ . Da mesma forma, a fração 42, apesar de sua múltipla composição de proteínas distintas, foi a que apresentou o maior  $DL_{50}$  e também o menor porcentual de lise na maior dose.

Visando então caracterizar as frações aparentemente já purificadas, foram realizadas novas corridas eletroforéticas buscando a caracterização das bandas apresentadas pela espectrometria de massas. No entanto, em um primeiro momento, isso só foi possível com a fração 32. Esta foi então aplicada no gel na presença ou não de agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol). Formaram-se dois fragmentos de banda de aproximadamente 24 kDa (sob condições redutoras) e 28 kDa (na ausência do redutor). Ambas as bandas foram recortadas e submetidas à tripsinização trípica *in gel* para caracterização pela espectrometria de massas.

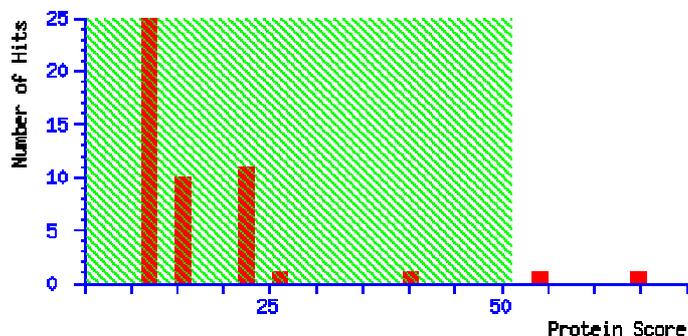
Os espectros MS/MS foram analisados através do algoritmo do programa MASCOT, e o banco de dados utilizado foi o NCBI. Como as amostras foram reduzidas e alquiladas, ou seja, as ligações dissulfeto dos resíduos cisteína foram rompidas e estabilizadas com a inserção de um grupamento alquil pela iodoacetamida, selecionou-se a carbamidometil (C) como modificação fixa. Cada espectro foi analisado separadamente e o resultado foi apresentado com base na somatória da pontuação gerada. As sequências obtidas de ambas as bandas digeridas do gel identificaram uma extensa homologia ( $p < 0,05$ ) com a proteína catrina, pertencente ao grupo de proteínas secretadas ricas em resíduos cisteína (CRiSP) isolada de *Crotalus atrox* (YAMAZAKI, HYODO & MORITA, 2003).

Na amostra enzimaticamente digerida referente a banda retida na presença de agente redutor (**Fig. 26**), as sequências obtidas apresentaram homologia no início da sequência (destacada em negrito). Na amostra enzimaticamente digerida referente à banda isolada na ausência de agente redutor (**Fig. 27**), as sequências obtidas apresentaram homologia no início e no final da sequência (destacadas em negrito), com uma cobertura de 23% de peptídeos idênticos. Os dados apresentados indicam que a proteína de Cvv tripsinizada e analisada pelo Q-Tof apresenta uma massa de 27541 e pI de 8,42, pela alta homologia com proteína Catrina, e portanto, por hora, a chamaremos de “catrina-like”.



1 MIAFIVLPIL AAVLQQSSGS VDFDSESPRK PEIQNKIVDL **HNFLRRSVNP 51**  
**TASNMLKMEW YPEAAANAER** WAYRCIESHS PRDSRVLGGI KCGENIYMSP  
**101** VPIKWTEIIH AWHGENKNFK YGIGAVPPNA VTGHFSQVWV  
YKSYRIGCAA **151** AYCPSSKYSY FYVCQYCPAG NIIGKTATPY  
KSGPPCGDCP SACDNGLCTN **201** PCTKEDKYTN CKSLVQQAGC  
QDKQMQSDCP AICFCQNKII

**Figura 26:** Gráfico gerado pelo programa MASCOT e análise das sequências da proteína de Cvv isolada na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, tripsinizada e analisada pelo Q-Tof, mostrando uma cobertura de 13% de peptídeos idênticos (em negrito), no início da sequência.



1 MIAFIVLPIL AAVLQQSSGS VDFDSESPRK PEIQNKIVDL **HNFLRRSVNP 51**  
**TASNMLKMEW YPEAAANAER** WAYRCIESHS PRDSRVLGGI KCGENIYMSP  
**101** VPIKWTEIIH AWHGENKNFK YGIGAVPPNA VTGHFSQVWV  
YKSYRIGCAA **151** AYCPSSKYSY FYVCQYCPAG NIIGKTATPY  
KSGPPCGDCP **SACDNGLCTN 201** **PCTKEDKYTN** CKSLVQQAGC  
QDKQMQSDCP AICFCQNKII

**Figura 27:** Gráfico gerado pelo programa MASCOT e análise das sequências da proteína de Cvv isolada na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, tripsinizada e analisada pelo Q-Tof, mostrando uma cobertura de 23% de peptídeos idênticos (em negrito), no início e no término da

sequência, onde  $p \geq 51$  indica extensiva homologia.

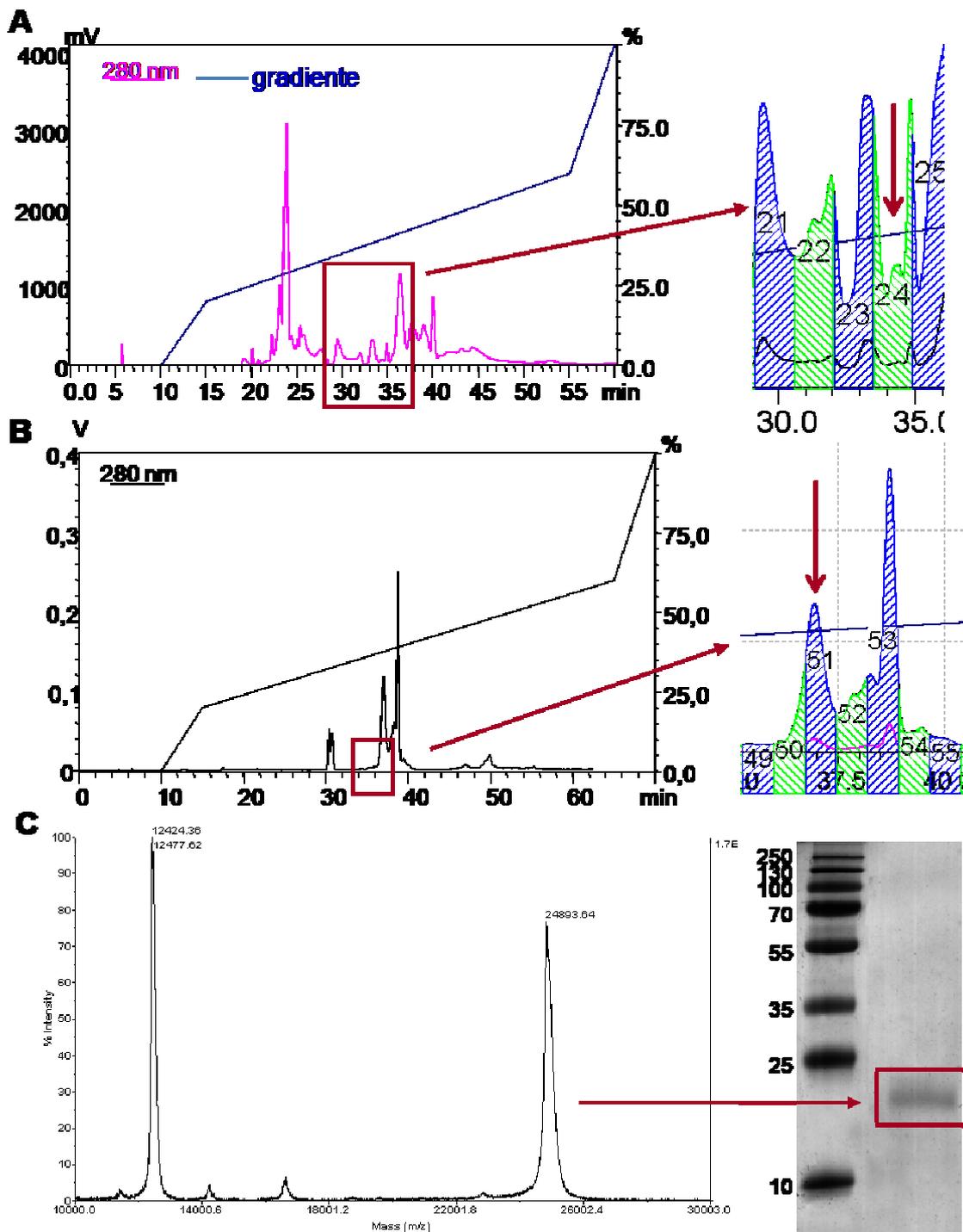
Fazendo uma análise da sequência obtida pela proteína não reduzida pelo programa BLAST do NCBI, a proteína de Cvv isolada apresentou uma homologia de 100% a diversas proteínas pertencentes à superfamília CRiSP, em especial as isoladas de venenos de serpentes, e homologia maior que 90% com diversas outras proteínas pertencentes a esta família (**tabela 8**).

**Tabela 8:** Análise de similaridade da sequência peptídica primária gerada por MS/MS (Q-tof) gerada a partir da amostra isolada na ausência de agente redutor.

Proteína	Registro	Nº de resíduos	Espécie	Homologia (%)
Catrina 1/2	Q7ZT99.1	240 AA	<i>C. atrox</i>	100
Psicovirina	Q7ZTAO.1	240 AA	<i>Agkistrodon p. piscivorus</i>	100
Natrina-1	Q7T1K6.1	239 AA	<i>Naja atra</i>	100
Triflina	Q8JI39.1	240 AA	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	100
Ofanina	Q7ZT98.1	239 AA	<i>Ophiophagus hannah</i>	100
Tigrina	Q8JGT9	237 AA	<i>Rhabdophis t. tigrinus</i>	100
Latisemina	Q8JI38	238 AA	<i>Laticauda semifasciata</i>	100

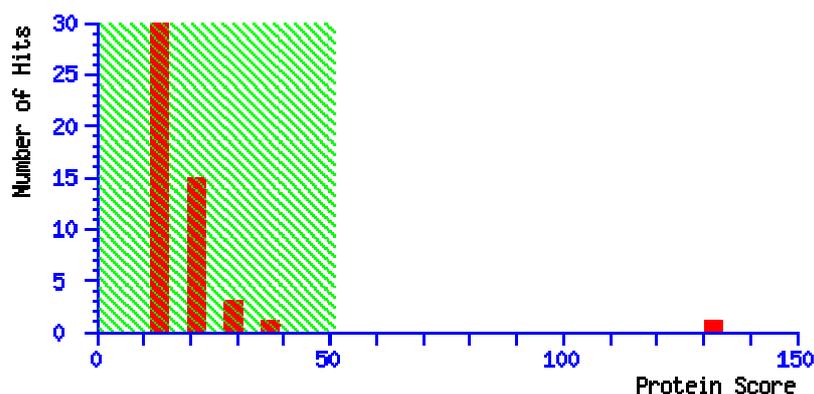
A partir da purificação deste componente protéico ainda não descrito do veneno de Cvv, novos ensaios foram realizados buscando a caracterização bioquímica do mesmo, a determinação de sua atividade sobre células musculares isoladas e principalmente, sobre o *T. cruzi*.

Inicialmente, foram realizadas um total de 13 cromatografias por HPLC para a obtenção dos tubos 23 e 24, onde a proteína foi eluída do veneno bruto de Cvv (**Fig. 28A**). Estes foram então submetidos a novas etapas de separação cromatográfica, e a proteína foi eluída como fração única e livre de impurezas no tubo 51 (**Fig. 28B**). O grau de pureza da amostra foi confirmado por SDS-PAGE (**Fig. 28C**) e pela análise dos espectros gerados pelo MALDI-TOF (**Fig. 28C**). As análises indicaram que a massa da proteína intacta é de 24.893 Da.



**Figura 28:** A. Cromatograma exibindo a primeira etapa de separação do veneno bruto de Cv onde a proteína “catrina-like” foi eluída entre os tubos 23 e 24. B. HPLC do tubo 24 obtido da primeira etapa de purificação do veneno de Cv, onde a região de eluição da proteína “catrina-like” isolada do veneno de Cv se concentrou no tubo 51. C. Espectro MS/MS mostrando o pico referente à proteína intacta purificada com  $m/z$  de 24.893,64 Da, e os picos de 12.424,36 e 12.477,62 referem-se às formas catiônicas de carga +2. SDS-PAGE mostrando a proteína “catrina-like”, aparentemente pura, isolada do veneno de Cv, com massa relativa de 23,6 kDa, sob condições redutoras (seta e detalhe em vermelho).

A banda única do gel foi novamente excisada e enzimaticamente digerida para nova análise pelo Q-TOF, para confirmação de que a proteína purificada correspondia à proteína “catrina-like” primeiramente identificada como um dos componentes do veneno de Cvv com atividade tripanocida (**Fig. 29**).



1 MIAFIVLPIL AAVLQQSSGS VDFDSESPRK PEIQNKIVDL **HNFLRRSVNP**  
**51 TASNMLKMEW YPEAAANAER** WAYRCIESHS PRDSRVLGGI  
 KCGENIYMSP **101** VPIKWTEIIH AWHGENKNFK YGIGAVPPNA  
 VTGHFSQVW YKSYRIGCAA **151** AYCPSSKYSY FYVCQYCPAG  
 NIIGKTATPY **KSGPPCGDCP SACDNGLCTN 201 PCTKEDKYTN**  
 CKSLVQQAGC QDKQMQSDCP AICFCQNKII

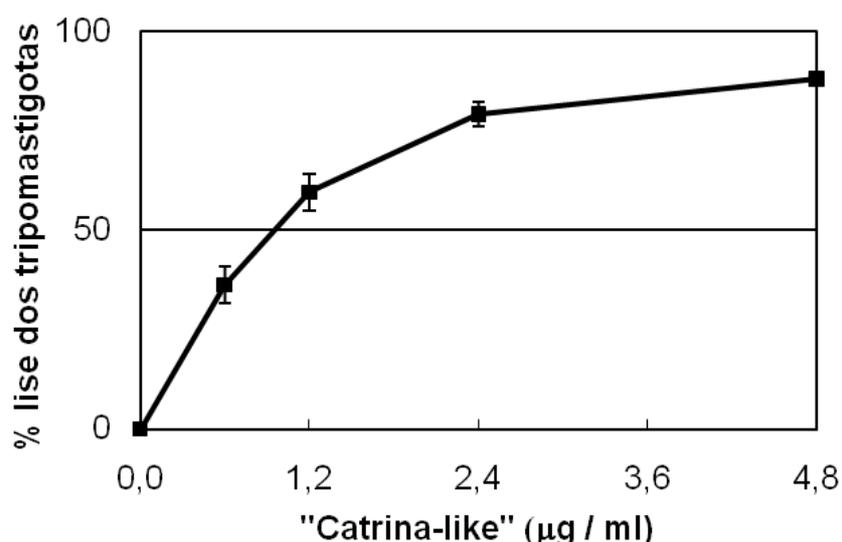
**Figura 29:** Gráfico gerado pelo programa MASCOT e análise das sequências mostrando uma cobertura de 23% de peptídeos idênticos (em negrito), no início da sequência e no término da sequência, onde  $p \geq 51$  indica extensiva homologia.

### **9. Atividade biológica da proteína “catrina-like” sobre formas tripomastigotas do *T. cruzi* e sobre células musculares isoladas de camundongos.**

A partir da confirmação da pureza da proteína e da igualdade de resultados da digestão enzimática das bandas de SDS-PAGE, foram realizados novos ensaios de atividade sobre formas tripomastigotas (clone CL-Brener) do *T. cruzi*. Estes foram incubados com as concentrações 0,6, 1,2, 2,4 e 4,8  $\mu\text{g/ml}$ , a 37°C por 24 h, e o efeito lítico quantificado em câmara de Neubauer. A análise confirmou a atividade tripanocida da amostra, com um valor de  $\text{DL}_{50}$  de

0,93 ± 0,06 µg/ ml (**Fig. 30**), e uma redução de 36,2 ± 4,5% a 88,1 ± 1,7% no n° de parasitos após as 24h de tratamento.

Formas tripomastigotas do clone CL-Brener foram tratadas ou não (controle) com 0,93 µg/ ml por 1, 2 e 24 h com a proteína pura, foram processadas e analisadas pela MET (**Fig. 31-35**).



**Figura 30:** Atividade de lise da fração referida à proteína purificada "catrina-like" do veneno de Cvv sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*.

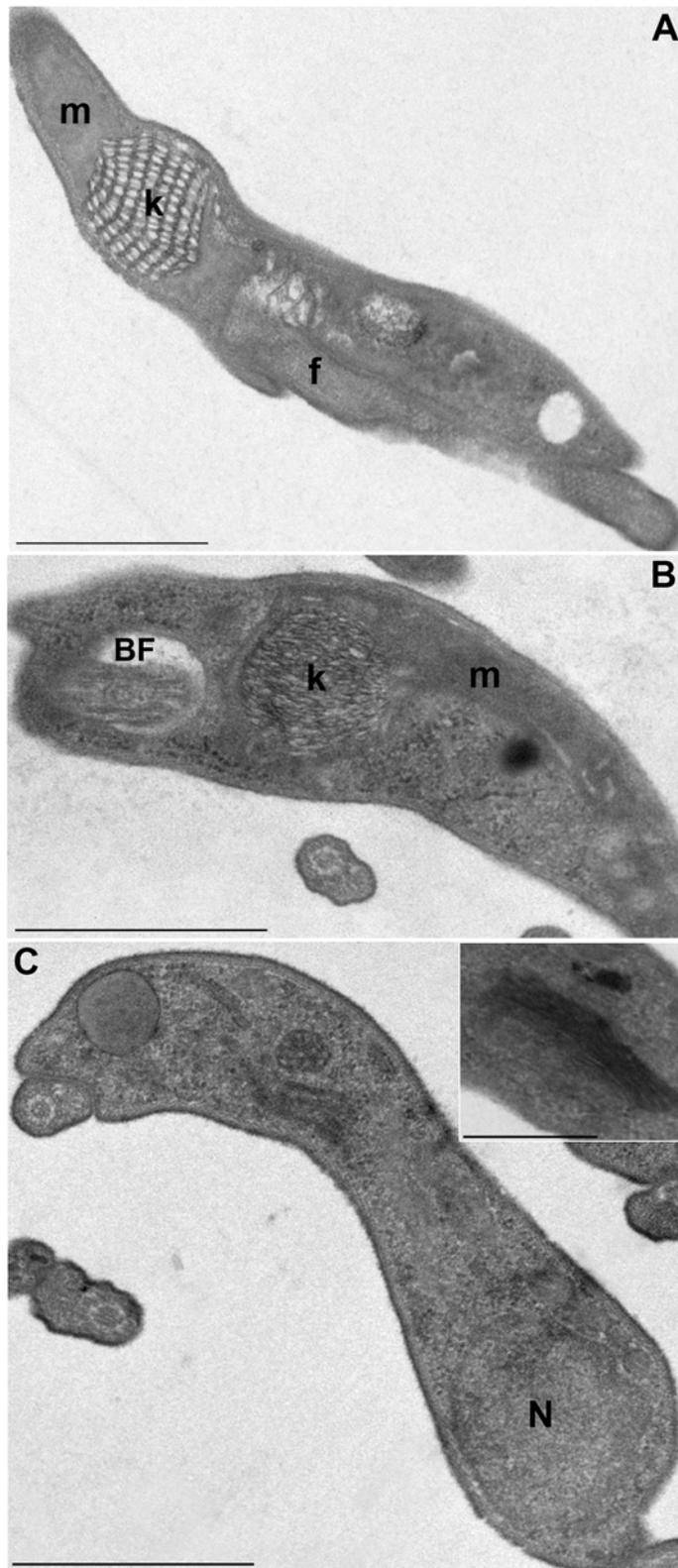
Os parasitos não tratados (**Fig. 31**) exibiram a ultraestrutura característica de formas tripomastigotas, como corpo celular alongado, DNA mitocondrial (cinetoplasto) (**Figs. 31 A, B**) característico, mitocôndria (**Figs. 31 A, B**), bolsa flagelar (**Figs. 31 A, B**), complexo de Golgi (**Fig. 31C, inset**) e núcleo (**Fig. 31C**).

Desde a primeira hora de tratamento (**Fig. 32**), os parasitos apresentaram diversas alterações morfológicas, principalmente na membrana plasmática e em organelas relacionadas a lisosomos. Os parasitos tratados apresentaram diversos tipos de projeções das membranas, como "blebs" de diferentes tamanhos e formas (**Figs. 32 A-C, E-G, I, L-M**) com, em alguns casos, aparente rompimento da membrana e extravasamento do conteúdo citoplasmático (**Fig. 32L**). As projeções se concentraram principalmente na região anterior do corpo celular dos parasitos, próximas à região do flagelo e bolsa flagelar, e também nas membranas do próprio flagelo. Em organelas relacionadas a lisosomos, as alterações observadas foram a presença de

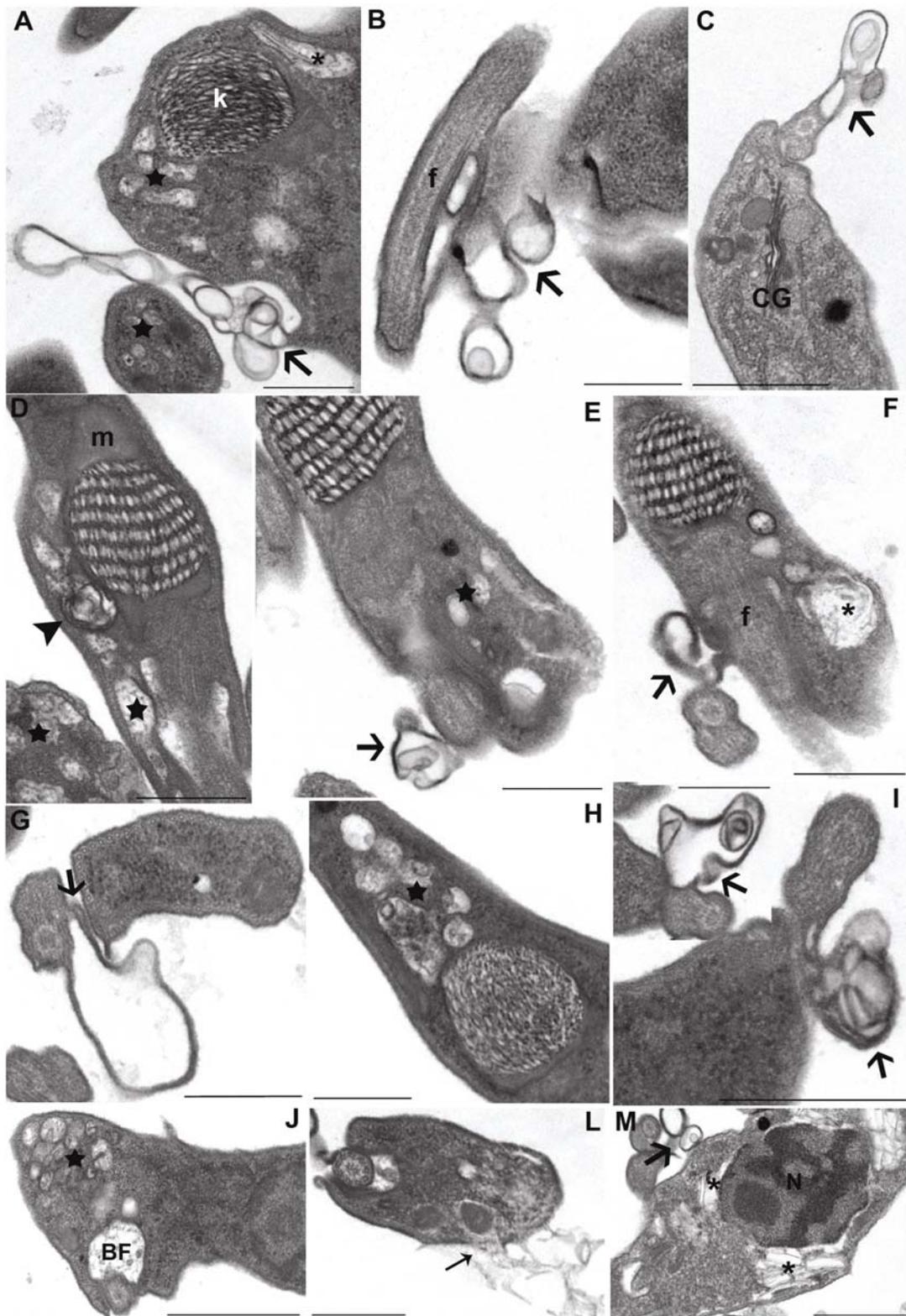
figuras de mielina (**Fig. 32D**) e inchaço destas estruturas (**Fig. 32 A, D-F, H, J, M**), muitas vezes com formação de grupamentos de estruturas arredondadas delimitadas por membrana (**Figs. 32 A, D, H, J**). As organelas relacionadas a lisosomos, em formas tripomastigotas, foram caracterizadas como sendo compartimentos citoplasmáticos delimitados por uma unidade única de membrana, com lúmen levemente eletrondenso e com inclusões eletronuscentes, sendo que algumas destas organelas também apresentam formações de membrana no interior do lúmen de natureza ou função ainda não caracterizada (SANT'ANNA *et al.*, 2008). Estas formações intralumenares ficaram muito evidentes em alguns dos parasitos tratados (**Figs. 32 A, M**), indicando uma provável ação desta proteína sobre estas estruturas. Não foram observadas alterações em estruturas como mitocôndria e núcleo.

Em células tratadas por 2h (**Fig. 33**) e 24h (**Fig. 34**), as mesmas alterações observadas nas membranas plasmáticas (**Figs. 33 C-E, G-M; 34 A-E**) e nas organelas relacionadas a lisosomos (**Figs. 33 B, E, F; 34 D, H, I**) repetiram-se intensamente. Além destas, as mitocôndrias também se apresentaram, em alguns casos, inchadas e com alargamento das cristas (**Figs. 33 A, C, D, F, N; 34 F, G**). Também foram notadas alterações nucleares, como um espaçamento dos folhetos das membranas que compõem a carioteca (**Figs. 33 A, D; 34F**), e a ocorrência de forte heterocromatinização (**Figs. 33 A, D; 34 F, G**), com até uma forte picnose da cromatina (**Fig. 33G**). Com 24h também foi ocasionalmente observada a presença de formações de membranas concêntricas na região da eucromatina (**Fig. 34F**). Após este período, muitos parasitos encontravam-se completamente lisados, com um marcado extravasamento citoplasmático, e muitos restos celulares de parasitos mortos foram observados nas seções ultrafinas (não mostrado). Não foi observada qualquer tipo de alteração na estrutura dos microtúbulos subpeliculares durante os diferentes períodos de tratamento. Além destas alterações, por vezes foi observada uma aparente separação das cisternas do complexo de Golgi (**Figs. 33C e 35C**), mas que não foram observadas com frequência, não podendo ser considerada como uma das alterações mais significativas observadas nos parasitos tratados. Em contrapartida, alguns dos parasitos tratados nos diferentes intervalos de tempo também apresentaram alterações na forma típica do cinetoplasto (**Fig. 35**). As alterações mais

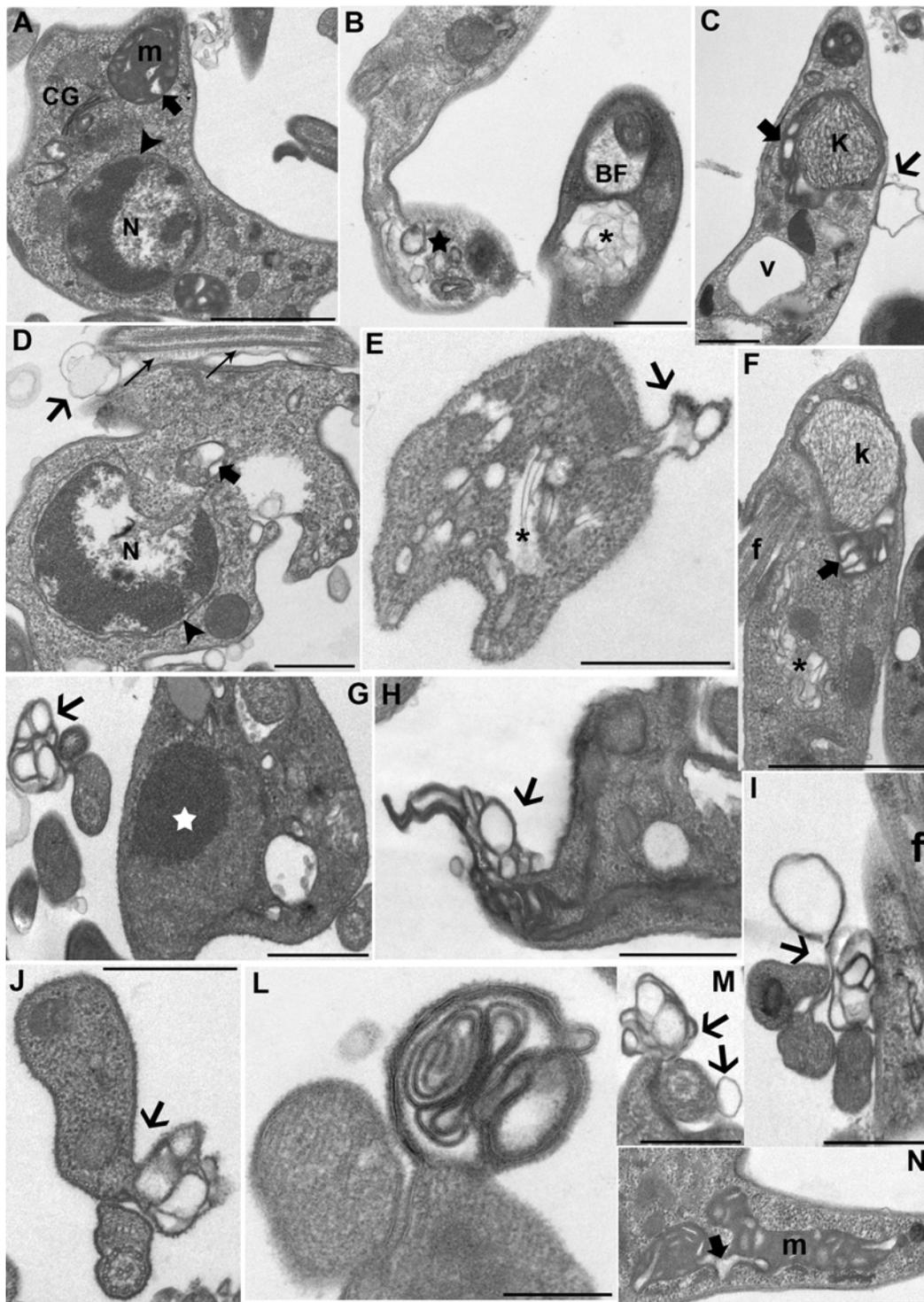
observadas foram uma desorganização da típica rede do DNA, com uma aparente separação destas estruturas (**Figs. 35 C, G, H**), por vezes formando espaços vazios em algumas regiões (**Figs. 35 A, B, D, H**) e de estruturas condensadas (**Fig. 35 E, F**). Também foi observado um aparente extravasamento de organelas relacionadas a lisosomos no cinetoplasto de alguns parasitos tratados (**Fig. 35G**).



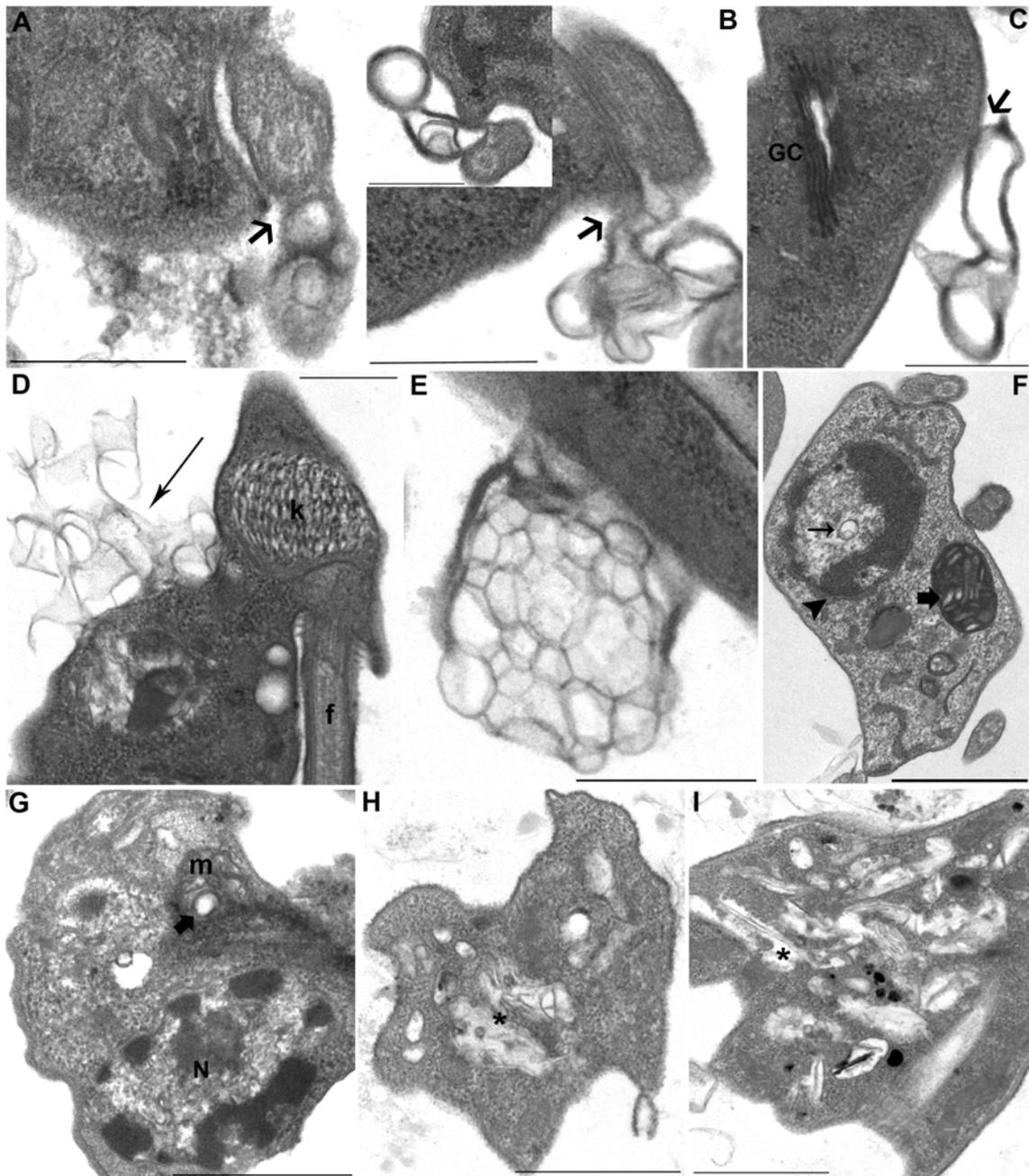
**Figura 31:** Formas tripomastigotas (clone CL-Brener) do *T. cruzi* não tratadas com a proteína “catrina-like” exibindo morfologia típica, como corpo alongado, mitocôndria (m), cinetoplasto (k), flagelo (f), bolsa flagelar (BF), núcleo (N) e complexo de Golgi (inset). Barras:1  $\mu\text{m}$ ; inset: 0,5  $\mu\text{m}$ .



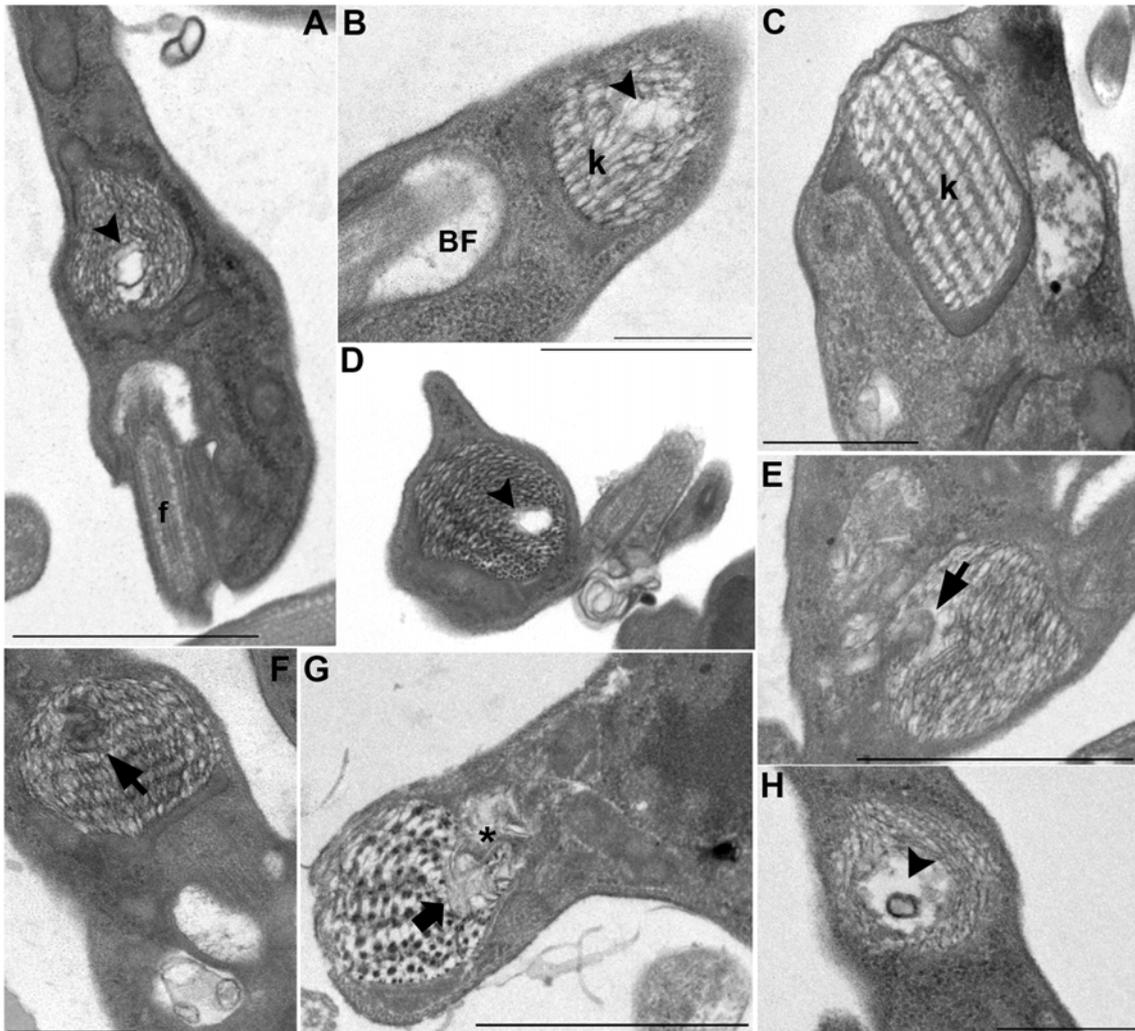
**Figura 32:** Tripomastigotas tratados por 1h com 0,93  $\mu\text{g/ml}$  da proteína “catrina-like”. Os parasitos apresentaram diversos tipos e tamanhos de projeções da membrana plasmática (setas), incluindo rompimento e extravasamento de conteúdo citoplasmático (seta fina em L). As organelas relacionadas a lisosomos também apresentaram inchaço (asteriscos), a formação de estruturas arredondadas delimitadas por membrana (estrelas), e a presença de figuras de mielina (cabeça de seta em D). f: flagelo; BF: bolsa flagelar; CG: complexo de Golgi; k: cinetoplasto; m: mitocôndria; N: núcleo. Barras: C, H, J, M: 1  $\mu\text{m}$ ; demais figuras: 0,5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 33:** Tripomastigotas tratados por 2h com 0,93  $\mu\text{g/ml}$  da proteína “catrina-like”. Os parasitos apresentaram diferentes morfologias de “blebs” na membrana plasmática (setas em C-E e G-M), incluindo uma dilatação da membrana do flagelo (setas finas em D). As organelas relacionadas a lisosomos também apresentaram inchaço (asteriscos em B, E, F). Em B, há a formação de estruturas arredondadas delimitadas por membrana (estrela preta). A mitocôndria (m) se apresentou inchada, com um aparente alargamento das cristas (setas grossas em A, C, F, N). A membrana nuclear apresentou discretas dilatações (cabeças de seta em A e D), e a cromatina excessivamente condensada na periferia dos núcleos (N) e até picnótica (estrela branca em G). Em (C) também pode ser vista a presença de um grande vacúolo (v) no citoplasma do parasito. f: flagelo; BF: bolsa flagelar; CG: complexo de Golgi; k: cinetoplasto. Barras: A, F: 1  $\mu\text{m}$ ; L: 0,2  $\mu\text{m}$ ; demais figuras: 0,5  $\mu\text{m}$ .

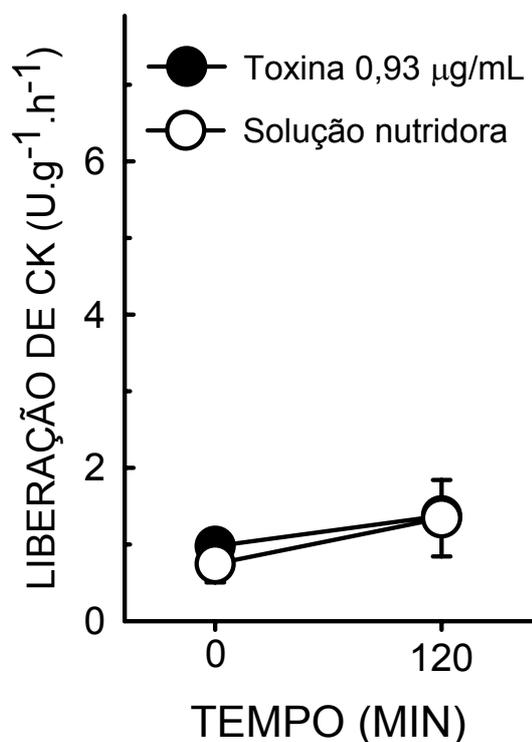


**Figura 34:** Tripomastigotas tratados por 24h com 0,93 µg/ml da proteína “catrina-like”. A membrana plasmática dos parasitos também apresentou diferentes projeções (setas em A, B, C), com rompimento e extravasamento de conteúdo citoplasmático (seta fina em D). As organelas relacionadas a lisosomos também apresentaram inchaço (asteriscos em H, I). As mitocôndrias (m) se apresentaram inchadas, com um aparente alargamento das cristas (setas grossas em F, G). O núcleo (N) apresentou uma discreta dilatação nas suas membranas (cabeça de seta em F), com a heterocromatina excessivamente condensada na periferia (F, G), e a formação de unidades de membrana concêntricas na região da eucromatina (seta fina em F). C: O complexo de Golgi (CG) apresentou uma dilatação entre algumas de suas cisternas. f: flagelo; BF: bolsa flagelar; k: cinetoplasto. Barras: A-E: 500 nm; F-I: 1 µm.



**Figura 35:** Principais alterações detectadas no cinetoplasto (k) de tripomastigotas tratados com 0,93 µg/ml da proteína “catrina-like”, nos diferentes intervalos de tempo. As alterações mais observadas foram a desorganização da rede típica do DNA, com uma aparente separação destas estruturas (C, G, H), a formação de espaços “vazios” em algumas regiões (cabeças de setas em A, B, D, H) e de estruturas condensadas (setas em E, F). G: Conteúdo extravasado (seta grossa) de organelas relacionadas a lisosomos (asterisco), aparentemente no interior da estrutura do cinetoplasto (k). H: Formação de unidade de membrana concêntrica no interior do cinetoplasto, na região desprovida da rede concatenada de DNA f: flagelo; BF: bolsa flagelar. Barras: A, D, E, G: 1 µm; B, C, F, H: 0,5 µm.

Uma vez que a proteína “catrina-like” purificada do veneno de Cvv apresentou uma considerável atividade *in vitro* sobre formas tripomastigotas do *T. cruzi*, iniciamos os ensaios de atividade da proteína sobre músculos *extensor digitorum longus* (EDL) isolados de camundongos (**Fig. 36**).



**Figura 36:** Atividade miotóxica da proteína “catrina-like” (0,93 µg/mL) em músculos EDL isolados de camundongos, mostrando que não houve liberação significativa de CK após 120 min. de exposição. Controle realizado com os músculos isolados na presença apenas de solução salina nutritora PSS.

A investigação do efeito miotóxico durante 120 minutos, por meio da liberação de CK dos músculos gastrocnemios EDL isolados, mostrou que a proteína catrina-like na concentração de 0,93 µg/ml não exerce toxicidade sobre as fibras musculares, uma vez que não houve liberação significativa de CK, sendo esta igual ao controle realizado apenas na presença da solução salina nutritora (PSS).

## VI. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento de doenças causadas por parasitos pode ter, como uma de suas ferramentas, a busca de compostos ativos presentes em produtos naturais, tais como óleos essenciais de vegetais e venenos animais. Os venenos de serpentes são misturas complexas de um grande número de polipeptídeos biologicamente ativos, polipeptídeos aparentemente inativos de relevância não determinada, e pequenas moléculas tais como adrenalina (HARRIS & CULLEN, 1990; PASSERO *et al.*, 2007).

A princípio, testamos a ação do veneno bruto de Cvv sobre formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. Em comparação com estudos prévios, onde foram utilizados diferentes venenos brutos de serpentes sobre formas epimastigotas, o valor obtido de DL<sub>50</sub> (0,5 µg/ ml) com o veneno de Cvv após um dia de tratamento está na faixa de concentração determinadas pelos tratamentos com veneno bruto de *B. jararaca* e *C. cerastes* (FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 1994; GONÇALVES *et al.*, 2002, DEOLINDO *et al.*, 2005). A lise das formas tripomastigotas não foi testada por estes autores com extratos de veneno bruto. O valor de DL<sub>50</sub> obtido após 24 h de tratamento com o veneno de Cvv foi de 0,3 µg/ ml, menor que o obtido para epimastigotas, indicando, talvez, um mecanismo diferente de ação, que será posteriormente discutido.

A marcação com IP e Rh 123 exibiu um comportamento diferente entre epimastigotas e tripomastigotas tratados com o veneno bruto de Cvv. Após a incubação de ambas as formas com veneno de Cvv em seus respectivos DL<sub>50</sub>, cerca de 40 e 60% dos tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente, eram IP-positivos, indicando que a lise da membrana celular é um aspecto importante para o efeito tripanocida do veneno. Contudo, a análise de Rh123, na concentração equivalente ao DL<sub>50</sub>, mostrou que a marcação dos tripomastigotas foi aproximadamente 50% menor em relação ao valor exibido pelos parasitos não tratados, e de 90% nas formas epimastigotas.

A reduzida retenção da Rh123 nos epimastigotas indica que a mitocôndria destes parasitos deve ser um alvo preferencial após a permeabilização da membrana plasmática, enquanto que nos tripomastigotas,

esta organela pode sofrer ação do veneno, mas não de forma tão dramática a ponto de ser considerada como um dos seus alvos preferenciais.

Os dados obtidos com a citometria de fluxo foram corroborados pela análise ultraestrutural dos epimastigotas e tripomastigotas tratados com o veneno de Cvv, contudo as alterações morfológicas apresentadas por ambas as formas foram semelhantes. Os epimastigotas tratados apresentaram-se significativamente mais inchados e com mitocôndrias mais danificadas (incluindo figuras de mielina) do que as formas tripomastigotas. Estes, em sua maioria, exibiram citoplasma mais denso e mitocôndrias menos inchadas, como pode ser visto na Fig. 14G. A lesão mais característica observada por estas formas foi a presença de grandes projeções de membrana do corpo celular e do flagelo, confirmando a ação do veneno na membrana dos parasitos.

Todas as alterações morfológicas observadas pela ultraestrutura e os dados obtidos pela citometria de fluxo sugerem que o veneno de Cvv provoca a morte dos parasitos através de um fenótipo de necrose. Estes resultados são similares aos de outros grupos que têm caracterizado a ação de diferentes drogas sobre formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009a). Os danos causados pelo tratamento com PLA<sub>2</sub> isoladas do veneno de serpentes também corresponde a um fenômeno de necrose, com um rápido rompimento da membrana plasmática, a liberação de componentes citosólicos, um proeminente influxo de Ca<sup>+2</sup> e um núcleo picnótico (revisto em HARRIS & CULLEN, 1990). No entanto, são necessários mais estudos neste sentido para confirmar a caracterização deste fenótipo no nosso modelo.

Um dos mais importantes achados no presente estudo foi o efeito do veneno de Cvv no ciclo intracelular do parasito. Os amastigotas são as formas intracelulares responsáveis pela manutenção da infecção da doença de Chagas nos indivíduos infectados, e tiveram sua proliferação inibida em concentrações significativamente menores do que as necessárias para lisar os tripomastigotas ou para causar danos às células hospedeiras. O veneno de Cvv foi pelo menos 10 mil vezes mais tóxicos para as formas amastigotas do que às células LLC-MK<sub>2</sub> (Fig. 16). Adicionalmente a estes dados, após 3-4 dias de infecção, em concentrações que ainda permitiam a propagação de todo o ciclo intracelular, foram observadas no meio de cultivo celular a presença de

formas intermediárias e tripomastigotas, que apresentavam várias alterações estruturais semelhantes às descritas para os parasitos tratados com o veneno isoladamente. Estes parasitos foram então, chamados de TDVs, e que quando submetidos a uma nova infecção, não se mostraram capazes de manter um novo ciclo intracelular mesmo na ausência de veneno. Isto foi confirmado não apenas pelo reduzido número de células de cultivo infectadas, mas também pelo número de amastigotas por 100 células (Fig. 18, tabela 7).

Nós não sabemos o mecanismo exato da ação tripanocida do veneno de Cvv, mas diferentemente do veneno de *B. jararaca*, a atividade foi inibida após 30 min. de fervura (GONÇALVES *et al.*, 2002), sugerindo o envolvimento de peptídeos e enzimas neste processo.

Os venenos de serpentes são sistemas redundantes (revisto em AIRD, 2002). Por exemplo, promovem a hipotensão via ação de proteases hemorrágicas, as quais rompem vasos sanguíneos, quininogenases que liberam bradicinina endógena e peptídeos potenciadores de bradicinina, os quais inibem a enzima conversora de angiotensina, com uma atividade hipotensora direta. Somado a isso, os venenos também possuem 5'-nucleotidases, fosfodiesterases e fosfomonoesterases, que liberam adenosina endógena e outros nucleosídeos. A adenosina, por exemplo, promove a vasodilatação cardíaca e aumento da permeabilidade vascular.

Diferentes trabalhos mostram que PLA<sub>2</sub>s isoladas do veneno de serpentes possuem a capacidade de induzir toxicidade nas células musculares, com efeitos drásticos sobre a membrana plasmática e mitocôndrias (revisto em GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003). O consenso geral do mecanismo de ação da PLA<sub>2</sub> é que a membrana plasmática é seu sítio primário de ação. Isto é influenciado diretamente pela composição lipídica da membrana, onde a existência de diferentes domínios enriquecidos em glicerofosfolipídeos ou glicolipídeos parecem formar sítios receptores específicos para estas PLA<sub>2</sub>s (revisto em GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003). Soma-se a estas características o fato de que estas enzimas também têm suas atividades influenciadas pela presença de cargas negativas na região externa das membranas plasmáticas celulares (DÍAZ *et al.*, 1991; 2001). OWNBY, COLBERG & WHITE (1997) mostraram que o veneno de Cvv possui, em sua composição, um polipeptídeo básico de 14 kDa, similar às PLA<sub>2</sub>s miotóxicas presentes em outros venenos de

serpentes, cuja atividade catalítica gera lise da membrana plasmática. As atividades da PLA<sub>2</sub> associadas com a mionecrose, rompimento de plaquetas, da função muscular, e o dano celular são muito evidentes no veneno de Cvv (MACKESSY, 2010).

As alterações ultraestruturais nas membranas dos parasitos, especialmente nas formas tripomastigotas, juntamente com os resultados que mostraram que o veneno bruto de Cvv teve sua atividade parcialmente inibida na presença do inibidor *p*-BPB (inibidor específico da PLA<sub>2</sub>), indicam que esta molécula deve agir diretamente sobre o parasito, de forma sinérgica com outros componentes presentes no veneno total. Estes dados explicariam a atividade remanescente de cerca de 30% do veneno bruto de Cvv parcialmente inibido pelo *p*-BPB, sob as condições de 0,3 µg/ ml de veneno após um dia de tratamento. Além disso, os danos mitocondriais mais severos observados em formas epimastigotas do *T. cruzi* são muito semelhantes aos relatados sobre as mitocôndrias em fibras musculares tratadas com a PLA<sub>2</sub> do veneno de Cvv como inchaço, separação e rompimento das cristas (OWNBY, COLBERG & WHITE, 1997).

Ainda com relação às diferentes atividades enzimáticas, alguns estudos prévios mostraram que L-aminoácido oxidases (L-AAOs) isoladas de diferentes venenos possuem atividade sobre diferentes espécies de *Leishmania* e formas tripomastigotas do *T. cruzi* (TEMPONE *et al.*, 2001; CISCOTTO *et al.*, 2009). Estas enzimas são as responsáveis pela cor amarela dos venenos de serpentes, e convertem aminoácidos livres em α-cetoácidos, gerando peróxido de hidrogênio e amônia (TU, 1996). A L-AAO ainda não foi caracterizada no veneno de Cvv, porém sua coloração amarelo intenso sugere a presença da enzima em sua composição. MACKESSY (2010), que caracterizou os componentes majoritários do veneno de diferentes espécies de *Crotalus*, indicou que a L-AAO está presente no veneno de Cvv, onde é representado em SDS-PAGE por uma banda de peso molecular de aproximadamente 66 kDa, e por uma atividade enzimática moderada sobre um substrato específico. Desta forma, a ação sinérgica entre a PLA<sub>2</sub> e a L-AAO poderia ser uma das principais responsáveis pelos efeitos observados nos parasitos tratados.

Visando caracterizar os componentes tripanocidas ativos no veneno de Cvv, foram realizadas diversas cromatografias e ensaios de atividade lítica

exclusivamente sobre formas tripomastigotas. Um destes componentes que foi completamente isolado e purificado foi uma proteína de 24.893,64 Da (Fig. 16), caracterizada por SDS-PAGE, pela espectrometria de massas e bioinformática das sequências, como sendo uma proteína secretada rica em domínios cisteína (CRiSP), com alta homologia à proteína catrina, isolada de *C. atrox* (YAMAZAKI, HYODO, & MORITA, 2003). É a primeira purificação e caracterização desta proteína no veneno de Cvv, a qual, por hora, chamamos de “catrina-like”. MACKESSY (2010) através de SDS-PAGE do veneno bruto de Cvv, indicou que este veneno deveria ter uma CRiSP pela visualização de uma banda na faixa de peso molecular que caracteriza esta família de proteínas.

A família das CRiSPs forma um grande grupo de proteínas secretadas com massa molecular de 20-30 kDa (revisto em YAMAZAKI & MORITA, 2004; MATSUNAGA *et al.*, 2009). Em mamíferos, as CRiSPs são divididas em quatro classes, onde a CRiSP-1 é secretada pelo epididimo proximal de maneira androgênio-dependente, associada com a maturação da superfície do espermatozoide durante a maturação, e posteriormente com a fusão do gameta; a CRiSP-2 é expressa apenas nos testículos e secretada dos espermatozoídeos, mediando a interação entre os mesmos e as células de Sertoli; a CRiSP-3 é amplamente distribuída entre outras classes como saliva, timo e grânulos neutrofílicos, indicando um possível papel desta proteína na defesa imune inata; e a CRiSP-4 é secretada exclusivamente no epitélio, também de maneira androgênio-dependente (revisto em MATSUNAGA *et al.*, 2009).

Diversas proteínas pertencentes a classe das CRiSPs têm sido identificadas nos venenos de lagartos (FRY *et al.*, 2006) e serpentes (JIN *et al.*, 2003; YAMAZAKI, HYODO, & MORITA, 2003; UTKIN & OSIPOV, 2007; PEICHOTO *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2010). Elas são distinguidas pela sequência de aminoácidos característica da família, tais como tamanho molecular de 22- 25 kDa (200-250 aminoácidos), com alto grau de similaridade e um padrão específico altamente conservado de 16 resíduos de cisteínas, os quais formam oito pontes dissulfeto (revisto em ROBERTS *et al.*, 2007). No geral, apesar das alta homologias apresentadas, estas proteínas recebem nomes distintos relacionados ao veneno do organismo do qual foram isolados. A primeira CRiSP descrita em répteis foi isolada da secreção da pele do lagarto

*Heloderma horridum*, sendo denominada helodermina (MOCHCA-MORALES, MARTIN & POSSANI, 1990). Entre os exemplos de proteínas isoladas dos venenos de serpentes, há a patagonina, isolada da *Philodryas patagonensis* (PEICHOTO *et al.*, 2009), a catrina da *C. atrox* (YAMAZAKI, HYODO, & MORITA, 2003), a latisemina isolada da cobra marinha *Laticauda semifasciata* e a tigrina isolada da *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (YAMAZAKI *et al.*, 2002). Algumas destas exemplificadas apresentam 100% de homologia com a proteína purificada neste trabalho, quando utilizado o banco de dados de proteína do NCBI (tabela 8).

Adicionalmente a estes dados, as proteínas isoladas dos venenos animais, tiveram suas atividades biológicas testadas sobre grilos, baratas (OSIPOV *et al.*, 2005) e principalmente sobre camundongos e seus diferentes tipos de células musculares. Não há relatos de experimentos usando microrganismos como células-alvo. Nesses organismos, os quais foram submetidos a ensaios de letalidade, nenhuma CRiSP se mostrou capaz de matá-los. Algumas destas proteínas se mostraram capazes de bloquear tanto canais de cálcio do tipo L, bloqueando assim a contração de células musculares lisas (YAMAZAKI *et al.*, 2002), quanto canais iônicos ligados a nucleotídeos cíclicos (BROWN *et al.*, 1999). A proteína catrina desempenhou um bloqueio moderado dos canais de cálcio do tipo L quando induzidos por  $K^+$ , parcialmente inibindo a contração das fibras lisas da artéria caudal de camundongos (YAMAZAKI, HYODO, & MORITA, 2003). A patagonina, que foi até então a única proteína desta família a desempenhar miotoxicidade sobre fibras musculares através da sua injeção no músculo gastrocnemio, não induziu a formação de edemas, hemorragia ou inibição sobre a agregação de plaquetas (PEICHOTO *et al.*, 2009). Ela também não induziu alterações sistêmicas em camundongos e nenhuma alteração histológica foi observada nos tecidos do cerebelo, cérebro, coração, fígado e baço. Nós iniciamos os ensaios de atividade miotóxica da proteína “catrina-like”, e esta, em acordo com a literatura, não apresentou atividade miotóxica sobre o músculo gastrocnemio EDL de camundongos incubados com 0,93  $\mu\text{g}/\text{ml}$  por 120 minutos. Desta forma, torna-se interessante a realização de futuros ensaios *in vivo* com esta proteína em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, já que

aparentemente, essa proteína não deve exercer uma toxicidade sistêmica considerável.

O tratamento de tripomastigotas com a proteína que isolamos, pertencente à família CRiSP, mostrou que esta possui uma alta atividade sobre estes parasitos ( $DL_{50}$  0,93  $\mu$ g/ ml). Após uma hora de tratamento, diversas alterações morfológicas foram observadas, principalmente sobre a membrana plasmática e sobre organelas relacionadas a lisosomos (Fig. 32). Estas alterações tornaram-se mais pronunciadas após 2 e 24 h de tratamento, além de outras alterações que também tornaram-se muito evidentes, como a heterocromatinização nuclear e a discreta separação entre as membranas nucleares, além das alterações no cinetoplasto mitocondrial dos parasitos (Fig. 33- 35).

Algumas das alterações observadas pela ultraestrutura dos parasitos tratados com esta proteína purificada condizem com as morfologias apresentadas pelos mesmos tratados com o veneno bruto de Cvv, incluindo as poucas alterações observadas na mitocôndria dos tripomastigotas, e a manutenção da densidade citoplasmática.

A diversidade dos venenos de serpentes retoma a questão do porquê os venenos apresentarem uma composição tão complexa e porque diversos destes componentes desempenham aparentemente as mesmas atividades, tais como metalo- e serino proteinases em um único veneno (MACKESSY, 2010). Os evidentes efeitos observados após a incubação com o veneno bruto de Cvv sobre as membranas plasmáticas dos parasitos, somado a uma forte, porém incompleta inibição da atividade do veneno após a incubação com o *p*-BPB, corroboram com a literatura sobre o efeito sinérgico entre os diferentes componentes moleculares presentes em veneno de serpentes. Alguns dos nossos resultados com o veneno bruto de Cvv, somados ao fato do conhecimento da existência de uma forte PLA<sub>2</sub> no mesmo, e o então desconhecimento da existência desta proteína que purificamos, nos fazia crer que a PLA<sub>2</sub> seria a grande responsável pelas alterações detectadas nas membranas dos parasitos. No entanto, após o tratamento com a proteína purificada da família CRiSP, ficou claro que, muito provavelmente, esta tem como um dos seus principais sítios de atividade a membrana dos parasitos. No entanto, diferentemente do que já se é sabido dos mecanismos de ação da

PLA<sub>2</sub> em células musculares, ainda se faz necessária uma melhor investigação para caracterizar a forma como essa proteína age sobre as membranas do parasito.

Os demais resultados obtidos após as sequenciais purificações também estão em acordo com a sinergia entre diferentes moléculas presentes no veneno bruto. As frações que se mostravam enriquecidas com diferentes componentes do veneno bruto de Cvv foram as que apresentavam os menores valores de DL<sub>50</sub> após 24 h de tratamento (Figs. 24 e 25). O veneno bruto possui diversas moléculas que isoladamente apresentam atividade tripanocida (Fig. 25 A, C), podendo agir sobre sítios primários de ação distintos, ou mesmo iguais, tais como a PLA<sub>2</sub> e a proteína que isolamos, pertencentes à família CRiSP.

É amplamente conhecido que a maior limitação das drogas empregadas para o tratamento da doença de Chagas é a baixa atividade sobre as formas amastigotas intracelulares na forma crônica da doença, provavelmente devido a uma limitada capacidade de penetração nos tecidos (URBINA & DOCAMPO, 2003). Nossos estudos demonstraram o potencial efeito do veneno bruto de Cvv principalmente sobre as formas intracelulares do parasito, em concentrações não tóxicas às células hospedeiras. Estes resultados, somados ao efeito tripanocida *in vitro* de uma proteína purificada, a ausência de miotoxicidade desta sobre músculos isolados, somados aos dados da literatura que indicam que as proteínas da família CRiSP apresentam baixa ou nenhuma atividade sobre camundongos, nos estimulam a realizar novos ensaios visando avaliar seu efeito sobre o ciclo intracelular do parasito, através da incubação de culturas celulares infectadas *in vitro*, e a realizar futuros ensaios *in vivo* com animais infectados com o *T. cruzi*.

## VII. CONCLUSÕES

### 1) O veneno bruto de Cvv é tóxico ao *Trypanosoma cruzi*

- O veneno bruto de Cvv é capaz de inibir a proliferação de epimastigotas de cultura e amastigotas intracelulares, e lisar os tripomastigotas de cultivo.
- O DL<sub>50</sub>/24 h para epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas foi de 0,50 ± 0,18, 0,30 ± 0,19 e 0,075 ± 0,01 µg/ ml, respectivamente. Estes dados permitem concluir que o veneno bruto de Cvv é ativo *in vitro* sobre as três formas evolutivas do *T. cruzi*, sendo que a menor concentração obtida de DL<sub>50</sub>/24 h foi para a inibição de formas amastigotas intracelulares.

### 2) Nas concentrações utilizadas, o veneno de Cvv não é tóxico para células LLC-MK<sub>2</sub>

- Em ensaio de toxicidade *in vitro* sobre culturas de células LLC-MK<sub>2</sub>, o veneno bruto de Cvv foi tóxico apenas na concentração de 1 mg/ ml, desde as primeiras 24 h de tratamento.
- As análises pela microscopia de luz e pela ultra-estrutura das culturas destas células, infectadas ou não, confirmaram os dados obtidos pela cinética de tratamento, demonstrando células íntegras em todas as concentrações utilizadas nos ensaios.

### 3) O tratamento com o veneno bruto de Cvv é efetivo contra a forma intracelular do parasito.

- As células infectadas e tratadas na faixa de concentração de 37,5 – 150 ng/ ml do veneno bruto de Cvv, por 4 dias, apresentaram um índice de infecção inferior às células controle.
- A análise da ultraestrutura dos amastigotas intracelulares mostrou que os mesmos apresentaram vacúolos inchados e lise da membrana celular.
- Foram observadas a presença de formas intermediárias e tripomastigotas no meio de cultivo celular incubados na presença de concentrações que ainda permitiam a propagação de todo o ciclo intracelular. Estas formas diferenciadas na presença do veneno (TDVs) apresentavam alterações estruturais e mostraram-se incapazes de manter um novo ciclo intracelular.

#### **4) Os principais alvos do veneno de Cvv parecem ser a membrana plasmática e a mitocôndria dos parasitos.**

- A análise por citometria de fluxo evidenciou um comportamento distinto entre epimastigotas e tripomastigotas tratados com o veneno bruto de Cvv e marcados com IP e Rh 123.

- Ambas as formas se apresentaram alto porcentual de marcação IP-positiva após 24 h de tratamento com o veneno bruto de Cvv, indicando que a lise da membrana celular é um aspecto importante para o efeito tripanocida do veneno. Além disso, ambas as formas também apresentaram decréscimo na marcação pela Rh 123 em suas mitocôndrias. A marcação consideravelmente reduzida nos epimastigotas (de até 90% no valor equivalente ao DL<sub>50</sub>) indica que a mitocôndria deve ser um alvo preferencial após a permeabilização da membrana plasmática nestas formas do parasito.

- Análise ultra-estrutural (MET e MEV) de formas epimastigotas e tripomastigotas confirmou as alterações evidenciadas pela citometria. Os epimastigotas tratados apresentaram-se significativamente mais inchados e com mitocôndrias mais danificadas do que as formas tripomastigotas. A lesão mais característica observada nestes, por sua vez, foi a presença de grandes projeções de membrana do corpo celular e do flagelo, confirmando a ação do veneno na membrana dos parasitos.

- Todas as alterações morfológicas observadas pela ultraestrutura e os dados obtidos pela citometria de fluxo sugerem que o veneno de Cvv mata os parasitos através de um fenótipo de necrose.

#### **5) O veneno de Cvv é composto de diferentes moléculas que agem sinergicamente sobre o parasito.**

- A fervura do veneno bruto de Cvv inibiu seu efeito, sugerindo o envolvimento de peptídeos e enzimas no processo de atividade biológica.

- O SDS-PAGE indicou que frações puras ou enriquecidas com diferentes componentes protéicos possuem atividade tripanocida, sendo que os menores valores de DL<sub>50</sub> foram apresentados pelas frações mais heterogêneas.

- As alterações ultraestruturais nas membranas dos parasitos, juntamente com a inibição parcial do veneno bruto de Cvv na presença do inibidor *p*-BPB

(inibidor específico da PLA<sub>2</sub>), além dos danos mitocondriais semelhantes aos previamente relatados sobre estas organelas em fibras musculares tratadas com a PLA<sub>2</sub> do veneno de Cvv, indicam que esta molécula deve agir diretamente sobre o parasito.

- O indicativo de presença de uma L-AAO no veneno bruto e a evidência em outros trabalhos previamente publicados com tripanosomatídeos tratados, também sugerem que esta enzima aja sobre as diferentes formas do *T. cruzi*.

- A proteína “catrina-like” purificada e isolada do veneno de Cvv se mostrou ativa sobre tripomastigotas, que exibiram alterações morfológicas marcantes na membrana dos parasitos e em organelas relacionadas a lisosomos, kDNA e núcleo.

- Estes resultados confirmam que a atividade apresentada pelo veneno bruto de Cvv pode ser creditada a mais de uma molécula componente.

#### **6) A proteína catrina-like não é miotóxica.**

- Os resultados mostram que a proteína catrina-like não exerce miotoxicidade sobre músculos EDL isolados de camundongos.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S.D. **Ophidian envenomation strategies and the role of purines.** *Toxicon*, 40 (4), 335-393, 2002.

AIRD, S.D. **Snake venom dipeptidyl peptidase IV: taxonomic distribution and quantitative variation.** *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 150 (2), 222-228, 2008

AKENDENGUE, B., NGOU-MILAMA, E., LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. **Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products.** *Parasite*, 6, 3-8, 1999.

ALBERS, G.W., AMARENCO, P., EASTON, J.D., SACCO, R.L. & TEAL, P. **Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke.** *Chest.*, 119, 300S-320S, 2001.

ALTMANN, K.H. **Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5, 424-431, 2001.

ANDRADE, L.O. & ANDREWS, N.W. **The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention.** *Nat Rev Microbiol.*, 3 (10), 819-823, 2005.

ANDRADE, A.L., ZICKER, F., DE OLIVEIRA, R.M., ALMEIDA SILVA, S., LUQUETTI, A., TRAVASSOS, L.R., ALMEIDA, I.C., DE ANDRADE, S.S., DE ANDRADE, J.G. & MARTELLI, C.M. **Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection.** *Lancet.*, 348,1407-1413, 1996.

ANDRADE, Z.A. **A patologia da doença de Chagas no homem.** *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, 65 (suppl 1),15-30, 1985.

ANTHONY, J.P., FYFE, L. & SMITH, H. **Plant active components- a resource for antiparasitic agents?** *Trends Parasitol.*, 21, 462-468. 2005.

APT, W., AGUILERA, X., ARRIBADA, A., PÉREZ, C., MIRANDA, C., SÁNCHEZ, G., ZULANTAY, I., CORTÉS, P., RODRIGUEZ, J. & JURI, D. **Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59 (1),133-138, 1998.

APT, W., ARRIBADA, A., ZULANTAY, I., SÁNCHEZ, G., , VARGAS, S.L. & RODRIGUEZ, J. **Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up.** *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 97 (1), 23-29, 2003.

ARAYA, C. & LOMONTE, B. **Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologues of snake venoms.** *Cell Biol. Int.*, 31, 263-268, 2007.

ATCLAS, J., SINAGRA, A., DICTAR, M., VERÓN, M.T., DE RISSIO, A.M., GARCÍA, M.M., SALGUEIRA, C. & RIARTE, A. **Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy.** *Bone Marrow Transplant.*,1-7, 2005.

ATCLAS, J., SINAGRA, A., JAIMOVICH, G., SALGUEIRA, C., LUNA, C., REQUEJO, A., MILOVIC, V., DE RISSIO, A., FELDMAN, L. & RIASTE, A. **Reactivation of chronic Chagas' disease following allogeneic bone marrow transplantation and successful pre-emptive therapy with benznidazole.** *Transpl. Infect. Dis.*, 1, 135-137, 1999.

AVILA, J.L., AVIAL, A. & MONZÓN, H. **Differences in allopurinol and 4-aminopyrazolo(3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 11, 51-60, 1984.

BARCÁN, L., LUNAÓ, C., CLARA, L., SINAGRA, A., VALLEDOR, A., DE RISSIOÍ, A.M., GADANOÁ, A., GARCÍA, M.M., SANTIBAÑES, E. & RIASTE, A. **Transmission of *T.cruzi* Infection Via Liver Transplantation to a Nonreactive Recipient for Chagas' Disease.** *Liver Transplant.*, 11(9), 1112-1119, 2005.

BARLOW, A., POOK, C.E., HARRISON, R.A. & WÜSTER, W. **Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution.** *Proc Biol Sci.*, 276 (1666), 2443-2449, 2009.

BARSOUM, R.S. **Parasitic infections in organ transplantation.** *Exp. Clin. Transplant.*, 2, 258-267, 2004.

BASSO, L.A., SILVA, L.H.P., FETT-NETO, A.G., AZEVEDO JUNIOR, W.F., MOREIRA, I.S., PALMA, M.S., CALIXTO, J.B., FILHO, S.A., SANTOS, R.R., SOARES, M.B.P. & SANTOS, D.S. **The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- A Review.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 (6), 575-606, 2005.

BATISTA, D.G.J., PACHECO, M.G.O., KUMAR, A., BRANOWSKA, D., ISMAIL, M.A., HU, L., BOYKIN, D.W. & SOEIRO, M.N.C. **Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitol.*, 21, 1-9, 2009.

BISAGGIO, D.F., ADADE, C.M. & SOUTO-PADRÓN, T. **In vitro effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*.** *Int. J. Antimicrob. Agents*, 31 (3), 282-286, 2008.

BISAGGIO, D.F., CAMPANATI, L., PINTO, R.C. & SOUTO-PADRÓN, T. **Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region.** *Acta Trop.*, 98 (2), 162-175, 2006.

BORST, P. & HOEIJMAKERS, J.H. **Kinetoplast DNA.** *Plasmid.*, 2, 20-40, 1979.

BOUTRIN, M.-C. F., FOSTER, H.A. & PENTREATH, V.W. **The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria.** *Exp. Parasitol.* 119, 246-151, 2008.

BOVERIS, A., SIES, H., MARTINO, E.E., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F. & STOPPANI, A.O. **Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*.** *Biochem. J.*, 188, 643-848, 1980.

BRACK, C. **Electronmicroscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*.** *Acta Trop.*, 25, 289-356, 1968.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.

BRAGA, M.V., MAGARACI, F., LORENTE, S.O., GILBERT, I. & DE SOUZA, W. **Effects of inhibitors of  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** Microsc. Microanal., 11, 506-515, 2005.

BRAGA, M.V., URBINA, J.A. & DE SOUZA, W. **Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*.** Int. J. Antimicrob. Agents, 24, 72-78, 2004.

BRAND, G.D., LEITE, J.R., SILVA, L.P., ALBUQUERQUE, S., PRATES, M.V., AZEVEDO, R.B., CARREGARO, V., SILVA, J.S., SÁ, V.C., BRANDÃO, R.A. & BLOCH, JR., C. **Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells.** J. Biol. Chem., 277 (51), 49332-49340, 2002.

BRAUD, S., PARRY, M.A., MAROUN, R., BON, C. & WISNER, A. **The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases.** J. Biol. Chem. 275 (3), 1823-1828, 2000.

BRENER, Z. & ALVARENGA, N.J. **Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector. Symposium on new approaches in American Trypanosomiasis Research.** Washington: Pan Amer. Health Org., 83-86, 1976.

BRENER, Z., CANÇADO, J.R., GALVÃO, L.M., DA LUZ, Z.M., FILARDI, L. DE S., PEREIRA, M.E., SANTOS, L.M. & CANÇADO, C.B. **An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 88 (1), 149-153, 1993.

BROGDEN, K. A. **Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?** Nat Rev Microbiol., 3 (3), 238-250, 2005.

BROWN, R.L., HALEY, T.L., WEST, K.A. & CRABB, J.W. **PSEUDECHETOXIN: A PEPTIDE BLOCKER OF CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELS.** PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A., 96 (2), 754-759, 1999.

BULTRÓN, E., GUTIÉRREZ, J.M. & THELESTAM, M. **Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A2, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle.** Toxicon, 31 (2), 217-222, 1993.

BURGOS, J.M., BEGHER, S.B., FREITAS, J.M., BISIO, M., DUFFY, T., ALTCHER, J., TEIJEIRO, R., LOPEZ ALCOBA, H., DECCARLINI, F., FREILIJ, H., LEVIN, M.J., LEVALLE, J., MACEDO, A.M. & SCHIJMAN, A.G. **Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 73 (6), 1016-1018, 2005

BUTLER, M.S. **The role of natural product chemistry in drug discovery.** J. Nat. Prod., 67, 2141-2153, 2004.

CAMANDAROBA, E.L., PINHEIRO LIMA, C.M. & ANDRADE, S.G. **Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection.** Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 44, 97-103, 2002.

CAMARGO, E.P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 6. 93-100, 1964.

CAMERON, D.L. & TU, A.T. **Characterization of myotoxin a from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*).** Biochem., 16 (11), 2546-2553, 1977.

CANÇADO, J.R. **Criteria of Chagas disease cure.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94 (supp 1), 331-336, 1999.

CANÇADO, J.R. **Terapêutica específica** In: Dias & Coura, orgs. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ; p323-351, 1997.

CASTEELS, P., AMPE, C., RIVIERE, L., VAN DAMME, J., ELICONE, C., FLEMING, M., JACOBS, F. & TEMPST, P. **Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*).** Eur J Biochem., 187 (2), 381-386, 1990.

CAVALIER-SMITH, T. **A revised six-kingdom system of life.** Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., 73, 203-266, 1998.

CAZZULO, J.J. **Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease.** Curr. Top. Med. Chem., 2 (11), 1261-1271, 2002.

CAZZULO, J.J., STOKA, V. & TURK, V. **Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*.** Biol. Chem., 378,1-10, 1997.

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

CHICHARRO, C., GRANATA, C., LOZANO, R., ANDREU, D., RIVAS, L. **N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (9), 2441-2449, 2001.

CHU S.T., CHENG, H.H., HUANGE, C.J., CHANG H.C., CHI, C.C., SU, H.H., HSU, S.S., WANG, J.L., CHEN, I.S., LIU S.I., LU, Y.C., HUANG, J.K., HO, C.M. & JAN, C.R. **Phospholipase A2-independent Ca<sup>2+</sup> entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells.** Life Sci., 80, 364- 369, 2007.

CISCOTTO, P., MACHADO DE AVILA, R.A., COELHO, E.A.F., OLIVEIRA, J., DINIZ, C.G., FARIAS, L.M., CARVALHO, M.A.R., MARIA, W.S., SANCHEZ, E.F., BORGES, A. & CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. **Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L -amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom.** Toxicon, 53, 330-341, 2009.

- CONLON, J.M., KOLODZIEJEK, J. & NOWOTNY, N. **Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs.** Biochim. Biophys. Acta, 1788, 1556-1563, 2009.
- CONTRERAS, V.T., SALLES, J.M., THOMAS, N., MOREL, C.M. & GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol. Biochem. Parasitol., 16, 315-327, 1985.
- CONTRERAS, L.M., VIVAS, J. & URBINA, J.A. **Altered lipid composition and enzyme activities of plasma membranes from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors.** Biochem. Pharmacol., 53 (5), 697-704, 1997.
- CORDOVA, E., BOSCHI, A., AMBROSIONI, J., CUDOS, C. & CORTI, M. **Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007.** Int. J. Infect. Dis., 12 (6), 587-592, 2008.
- CORONA, S.S., AMANALES, C., AVARIA, M.B. & DE LOS, A. **Granuloma chagásico del cerebro en un paciente con leucemia linfoblástica.** Rev. Med. Chile, 116, 676-680, 1988.
- CORRALES, M., CARDOZO, R., SEGURA, M.A., URBINA, J.A. & BASOMBRÍO, M.A. **Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease.** Antimicrob. Agents Chemother., 49 (4), 1556-1560, 2005.
- CORRÊA, A.F.S., ANDRADE, L.R. & SOARES, M.J. **Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms.** Parasitol. Res., 88, 875-880, 2002.
- CORRÊA JR., M.C.C., MARIA, D.A., MOURA-DA-SILVA, A.M., PIZZOCARO, K.F. & RUIZ, I.R.G. **Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin.** Toxicon, 40, 739-748, 2002.
- COURA, J.R. & DE CASTRO, S.L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97, 3-24, 2002.
- COURA, J.R. **Currents prospects of specific treatment of Chagas' disease.** Bol. Chil. Parasitol., 51, 69-75, 1996.
- CRAGER, S.E. & PRICE, M. **Prizes and Parasites: Incentive Models for Addressing Chagas Disease.** J. Law, Med. Ethics, 292-304, 2009.
- CROFT, S.L., BARRETT, M.P. & URBINA, J.A. **Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis.** Trends Parasitol., 21(11), 508-512, 2005.
- CURA, J.E., BLANZACO, D.P., BRISSON, C., CURA, M.A., CABROL, R., LARRATEGUY, L., MENDEZ, C., SECHI, J.C., SILVEIRA, J.S., THEILLER, E., ROODT, A.R. & VIDAL, J.C. **Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA<sub>2</sub>, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer.** Clin. Cancer Res., 8, 1033-1041, 2002.

DAGAN, A., EFRON, L., GAIDUKOV, L., MOR, A. & GINSBURG, H. **In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1059-1066, 2002.

DALIRY, A., DA SILVA, P.B., DA SILVA, C.F., BATISTA, M.M., DE CASTRO, S.L., TIDWELL, R.R. & SOEIRO, M.N.C. **In vitro analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*.** *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 747-750, 2009.

DANTAS, A.P., SALOMÃO, K., BARBOSA, H.S. & DE CASTRO, S.L. **The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 207-211, 2006.

DARDONVILLE, C. **Recent advance in antitrypanosomal chemotherapy: patent literature 2002- 2004.** *Expert Opin. Ther. Pat.*, **15** (9), 1241-1257, 2005.

DE CARVALHO, E.A., ANDRADE, P.P., SILVA, N.H., PEREIRA, E.C. & FIGUEIREDO, R.C.Q.B. **Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study.** *Micron* **36**, 155-161, 2005.

DE CASTRO, S.L. **The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*.** *Acta Trop.*, **53**, 83-98, 1993.

DE LUCCA, A.J., BLAND, J.M., JACKS, T.J., GRIMM, C. & WALSH, T.J. **Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin.** *Med. Mycol.*, **36**, 291-298, 1998.

DE SOUZA, E.M., LANSIAUX, A., BAILLY, C., WILSON, W.D., HU, Q., BOYKIN, D.W., BATISTA, M.M., ARAÚJO-JORGE, T.C. & SOEIRO, M.N.C. **Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*.** *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 593-600, 2004.

DE SOUZA, E.M., OLIVEIRA, G.M., BOYKIN, D.W., KUMAR, A., HU, Q. & SOEIRO, M.N.C. **Trypanocidal activity of the phenyl-substituted analogue of furamide DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection in vivo.** *J. Antimicrob. Chemother.*, **58**, 610-614, 2006.

DE SOUZA, W. & RODRIGUES, J.C.F. **Sterol Biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs.** *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2009, 642502, 2009.

DE SOUZA, W. **A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (supp. 1), 17-36, 1999.

DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Int. Rev. Cytol.*, **86**, 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. **Components of cell surface of Trypanosomatids.** *Progr. Protozool.* **1**, 87-184, 1989.

DE SOUZA, W. **Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa.** *Parasitol. Int.*, **56** (3), 161-170, 2007.

- DE SOUZA, W. **Ultra-estrutura do *Trypanosoma cruzi***. *Ciênc. Cult.*, 31, 35-47, 1980.
- DE SOUZA, W., MARTINEZ-PALOMO, A. & GONZALEZ-ROBBLES, A. **The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze-fracture**. *J. Cell Sci.*, 33, 285-299, 1978.
- DE SOUZA, W., SANT'ANNA, C. & CUNHA-E-SILVA, N. **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa**. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 44 (2), 67-124, 2009.
- DE SOUZA, W. & SOUTO-PADRÓN, T. **The cell surface of *Trypanosoma cruzi***. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79, 1-5, 1984.
- DEANE, M.P., LENZI, H.L. & JANSEN, A.M. ***Trypanosoma cruzi*: Vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis***. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79, 513-515, 1984.
- DEOLINDO, P., TEIXEIRA-FERREIRA, A.S., MELO, E.J.T., ARNHOLDT, A.C.V., DE SOUZA, W., ALVES, E.W. & DAMATTA, R.A. **Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 (1), 33-38, 2005.
- DIAS, E. **Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi***. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 28, 1-110, 1934.
- DIAS, J.C.P. **Chagas disease: successes and challenges**. *Cad. Saúde Públ.*, 22 (10), 2020-2021, 2006a.
- DIAS, J.C.P. **Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características biológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39 (4), 370-375, 2006b.
- DÍAZ, C., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. & GENÉ, J.A. **The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A<sub>2</sub>, anticoagulant and myotoxic activities**. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1070 (2), 455-460, 1991.
- DÍAZ, C., LEÓN, G., RUCAVADO, A., ROJAS, N., SCHROIT, A.J. & GUTIÉRREZ, J.M. **Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A(2): role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 391 (1), 56-64, 2001.
- DIAZ DE TORANZO, E.G., CASTRO, J.A., FRANKE DE CAZZULO, B.M. & CAZZULO, J.J. **Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi***. *Experientia*, 44, 880-881, 1988.
- DIAZ-ACHIRICA, P., UBACH, J., GUINEA, A., ANDREU, D. & RIVAS, L. **The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide**. *Biochem. J.*, 330, 453-460, 1998.
- DIAZGRANADOS, C.A., SAAVEDRA-TRUJILLO, C.H., MANTILLA, M., VALDERRAMA, S.L., ALQUICHIRE, C. & FRANCO-PAREDES, C. **Chagasic**

**encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association.** Lancet Inf. Dis., 298, 2171-2181, 2009.

DIAZ-UNGRÍA, C. **La mosca doméstica como transmisora del *Trypanosoma cruzi*.** Ver. Univ. Zulia, 44, 114-119, 1969.

DIAZ-UNGRÍA, C. & BRACHO, J.S. **Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* em perros infectados por la via bucal: nuevos estudios.** Rev. Vet. Venez., 29, 271-178, 1970.

DIAZ-UNGRÍA, C. & ZEUSS, M. **Transmisión del *Trypanosoma cruzi* a partir de heces de animales infectados por via bucal.** Rev. Vet. Venez., 30, 187-193, 1971.

DIEZ, M., FAVALORO, L., BERTOLOTTI, A., BURGOS, J.M., VIGLIANO, C., LASTRA, M.P., LEVIN, M.J., ARNEDEO, A., NAGEL, C., SCHIJMAN, A.G. & FAVALORO, R.R. **Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation.** Am. J. Transplant., 7 (6), 1633-1640, 2007.

DO SOCORRO, S., ROSA, M.S., MENDONÇA-FILHO, R.R., BIZZO, H.R., DE ALMEIDA RODRIGUES, I., SOARES, R.M., SOUTO-PADRÓN, T., ALVIANO, C.S. & LOPES, A.H. **Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*.** Antimicrob. Agents Chemother., 47, 1895-1901, 2003.

DOCAMPO, R. & MORENO, S.N. **Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites.** Curr. Drug Targets Infect. Disord., 1 (1), 51-61, 2001.

DOCAMPO, R. **Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs.** Chem. Biol. Interact., 73, 1-27, 1990.

DOCAMPO, R., DE SOUZA, W., MIRANDA, K., ROHLOFF, P. & MORENO, S.N. **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man.** Nat. Rev. Microbiol., 3, 251-261, 2005.

DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. **Free radical metabolism of antiparasitic agents.** Fed. Proc., 45, 2471-2476, 1986.

DOCAMPO, R., SCOTT, D.A., VERCESI, A.E. & MORENO, S.N. **Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*.** Biochem. J., 310, 1005-1012, 1995.

DVORAK, J.A., ENGEL, J.C., LEAPMAN, R.D., SWYT, C.R. & PELLA, P.A. ***Trypanosoma cruzi*: Elemental composition heterogeneity of cloned stocks.** Mol. Biochem. Parasitol., 31, 19-26, 1988.

DVORAK, J.A. & HYDE, T.P. ***Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. Individual interactions at the cellular and subcellular levels.** Exp. Parasitol., 34, 268-283, 1973.

ELLERBY, H.M., ARAP, W., ELLERBY, L.M., KAIN, R., ANDRUSIAK, R., RIO, G.D., KRAJEWSKI, S., LOMBARDO, C.R., RAO, R., RUOSLAHTI, E., BREDESEN, D.E. &

- PASQUALINI, R. **Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides.** *Nat. Med.*, 5, 1032-1038, 1999.
- EL-RAFAEL, M.F. & SARKAR, N.H. **Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells *in vitro* and *in vivo*.** *Toxicon*, 54, 33-4, 2009.
- FABIANO, R.J. & TU, A.T. **Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom.** *Biochem.*, 20 (1), 21-27, 1981.
- FENARD, D., LAMBEAU, G., VALENTIN, E., LEFEBVRE, J.C., LAZDUNSKI, M. & DOGLIO, A. **Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells.** *J. Clin. Invest.*, 104, 611-618, 1999.
- FERNANDEZ-GOMEZ, R., ZERROUK, H., SEBTI, F., LOYENS, M., BENSLIMANE, A. & OUAISSI, M.A. **Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* infantum by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites.** *Toxicon*, 32(8), 875-882, 1994.
- FERRAZ, M.L., GAZZINELLI, R.T., ALVES, R.O., URBINA, J.A. & ROMANHA, A.J. **The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (4), 1359-1364, 2007.
- FIGUEIREDO, R.C., ROSA, D.S., GOMES, Y.M., NAKASAWA, M. & SOARES, M.J. **Reserosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation.** *Parasitol.*, 129, 431-438, 2004.
- FIGUEIREDO, R.C., STEINDEL, M. & SOARES, M.J. **The reserosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: Occurrence during *in vitro* cultivation.** *Parasitol. Res.*, 80, 517-522, 1994.
- FONTANA, R., MENDES, M.A., SOUZA, B.M., KONNO, K., CÉSAR, L.M.M., MALASPINA, O. & PALMA, M.S. **Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*).** *Peptides*, 25, 919-928, 2004.
- FOURNET, A., ANGELO, A., MUÑOZ, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R. & CAVE, A. **Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis.** *J. Ethnopharmacol.*, 37, 159-164, 1992.
- FOURNET, A., BARRIOS, A.A. & MUÑOZ, V. **Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants.** *J. Ethnopharmacol.*, 41, 19-37, 1994.
- FOURNET, A. & MUÑOZ, V. **Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs.** *Curr. Top. Med. Chem.*, 2, 1215-1237, 2002.
- FOX, J.W., ELZINGA, M. & TU, A.T. **Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin a isolated from the venom of Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*).** *Biochem.*, 20;18 (4), 678-684, 1979.
- FOX, J.W. & SERRANO, S.M. **Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-**

**derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications.** *Curr Pharm Des.*, 13 (28), 2927-2934, 2007.

FRY, B.G., VIDAL, N., NORMAN, J.A., VONK, F.J., SCHEIB, H., RAMJAN, S.F., KURUPPU, S., FUNG, K., HEDGES, S.B., RICHARDSON, M.K., HODGSON, W.C., IGNJATOVIC, V., SUMMERHAYES, R. & KOCHVA, E. **Early evolution of the venom system in lizards and snakes.** *Nature*, 439 (7076), 584-588, 2006.

FUJIWARA, S., IMAI, J., FUJIWARA, M., YAESHIMA, T., KAWASHIMA, T. & KOBAYASHI, K. **A potent antibacterial protein in Royal Jelly.** *J. Biol. Chem.*, 265 (19), 11333-11337, 1990.

GADELHA, F.R., MORENO, S.N.J., DE SOUZA, W., CRUZ, F.S. & DOCAMPO, R. **The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 34, 117-126, 1989.

GALHARDO, M.C., MARTINS, I.A., HASSLOCHER-MORENO, A., XAVIER, S.S., COELHO, J.M., JUNQUEIRA, A.C. & DOS SANTOS, R.R. **Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32, 291-294, 1999.

GALLERANO, V., CONSIGLI, J., PEREYRA, S., GÓMEZ ZANNI, S., DANIELO, C., GALLERANO, R.H. & GUIDI, A. **Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant.** *Int. J. Dermatol.*, 46 (6), 607-610, 2007.

GARZA, J.J., DOWNARD, C.D., CLAYTON, N., MAHER, T.J. & FAUZA, D.O. ***Clostridium botulinum* toxin inhibits myometrial activity in vitro: Possible application on the prevention of preterm labor after fetal surgery.** *J. Pediat. Surgery*, 38, 511-513, 2003.

GARZONI, L.R., CALDERA, A., MEIRELLES, M.N.L., DE CASTRO, S.L., DOCAMPO, R., MEINTS, G.A. & URBINA, J.A. **Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*.** *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23, 273-285, 2004.

GOBBI, P., LO PRESTI, M.S., FERNÁNDEZ, A.R., ENDERS, J.E., FRETES, R., GEA, S., PAGLINI-OLIVA, P.A. & RIVAROLA, H.W. **Allopurinol is effective to modify the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** *Parasitol. Res.*, 101 (5), 1459-1462, 2007.

GOIJMAN, S.G., FRASCH, A.C.C. & STOPPANI, A.O.M. **Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs.** *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1457-1461, 1985.

GONÇALVES, A.R., SOARES, M.J., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. & ALVES, E.W. **Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom.** *Parasitol. Res.*, 88, 598-602, 2002.

GONZÁLEZ-MARTÍN, G., FIGUEROA, C., MERINO, I. & OSUNA, A. **Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomotropic carrier.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 49 (2), 137-142, 2000.

GOPALAKRISHNAKONE, P., DEMPSTER, D.W., HAWGOOD, B.J. & ELDER, H.Y. **Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal**

**muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex.** *Toxicon*, 22 (1), 85-98, 1984.

GRAHAM, R.L.J., GRAHAM, C., MCCLEAN, S., CHEN, T., O'ROURKE, M., HIRST, D., THEAKSTON, D. & SHAW, C. **Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World Crotalinae pit vipers.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 338 (3), 1587-1592, 2005.

GRIFFIN, P.R. & AIRD, S.D. **A new small myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*).** *FEBS Lett.*, 12, 274 (1-2), 43-47, 1990.

GRISOTTO, L.S., MENDES, G.E., CASTRO, I., BAPTISTA, M.A., ALVES, V.A., YU, L. & BURDMANN, E.A. **Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure.** *Toxicon*, 48, 44- 54, 2006.

GUEDES, P.M., URBINA, J.A., DE LANA, M., AFONSO, L.C., VELOSO, V.M., TAFURI, W.L., MACHADO-COELHO, G.L., CHIARI, E. & BAHIA, M.T. **Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (11), 4286-4292, 2004.

GUNASEKERA, S.P., MICKEL, S.J., DAEFFLER, R., NIEDERER, D., WRIGHT, A.E., LINLEY, P. & PITTS, T. **Synthetic analogues of the microtubule-stabilizing agent (+)-discodermolide: preparation and biological activity.** *J. Nat. Prod.*, 67, 749-756, 2004.

GUS, I., MOLON, M.E. & BUENO, A.P. **Chagas disease: Review of 8 simultaneous cases of acute Chagas myocarditis: 25 years later.** *Arq. Bras. Cardiol.*, 60, 99-101, 1993.

**GUTIÉRREZ, J.M. & OWNBY, C.L.** Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42 (8), 915-931, 2003.

GUTTERIDGE, W.E. **New anti-protozoal agents.** *Int. J. Parasitol.*, 17, 121-129, 1987.

GUTTERIDGE, W.E., ROSS, J., HARGADON, M.R. & HUDSON, J.E. ***Crithidia fasciculata*: a catalase-containing trypanosomatid sensitive to nitroheterocyclic drugs.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76 (4), 493-496, 1982.

HANNAERT, V., BRINGAUD, F., OPPERDOES, F.R. & MICHELS, P.A. **Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida.** *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, 2 (1), 1-30, 2003.

HARRIS, J.B. & CULLEN, M.J. **Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins.** *Electron Microsc. Rev.*, 3 (2), 183-211, 1990.

HARRIS, J.B. & MALTIN, C.A. **Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*.** *Br. J. Pharmacol.*, 76 (1), 61-75, 1982.

HARVEY, A.L., BRADLEY, K.N., COCHRAN, S.A., ROWAN, E.G., PRATT, J.A., QULLFELDT, J.A. & JERUSALINSK, D.A. **What can toxins tell us for drug discovery?** *Toxicon*, 36, 1635-1640, 1998.

HAYES, W.K. **Factors associated with the mass of venom expended by prairie rattlesnakes (*Crotalus v. viridis*) feeding on mice.** *Toxicon*, 30 (4), 449-460, 1992.

HAYNES, R. **Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment?** *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 14, 719-726, 2001.

HERNANDEZ, C., MOR, A., DAGGER, F., NICOLAS, P., HERNANDEZ, A., BENEDETTI, E.L. & DUNIA, I. **Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin.** *Eur. J. Cell Biol.*, 59, 414-424, 1992.

JANNIN, J. & VILLA, L. **An overview of Chagas disease treatment.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102 (suppl. I), 95-95, 2007.

JANSEN, A.M., MADEIRA, F., CARREIRA, J.C., MEDINA-COSTA, E. & DEANE, M.P. ***Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: A study of the correlations and kinetics of the systemic and scent gland infections in naturally and experimentally infected animals.** *Exp. Parasitol.*, 86, 37-44, 1997.

JARAMILLO, M.C., ARANGO, G.J., GONZALEZ, M.C., ROBLEDO, S.M. & VELEZ, I.D. **Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata pericarp*.** *Fitoter.*, 71, 183-186, 2000.

JIN, Y., LU, Q., ZHOU, X., ZHU, S., LI, R., WANG, W. & XIONG, Y. **Purification and cloning of cysteine-rich proteins from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms.** *Toxicon*, 42 (5), 539-547, 2003.

JOHNSTON, S.A., GELMON, K., MAYER, L.D., HANCOCK, R.E. & BALLY, M.B. **In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic tumor cell lines.** *Anti-Cancer Drug Des.*, 15, 151-160, 2000.

JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. **Accidents caused by poisonous snakes from Brazil.** *AMB Rev. Assoc. Med. Bras.*, 36 (2), 66-77, 1990.

JUNQUEIRA, A.C.V., DEGRAVE, W. & BRANDÃO, A. **Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations.** *Trends Parasitol.*, 21(6), 270-272, 2005.

KINI, R.M. **Proline brackets and identification of potential functional sites in proteins: toxins to therapeutics.** *Toxicon*, 36, 1659-1670, 1998.

KINOSHITA-YANAGA, A.T., TOLEDO, M.J., ARAÚJO, S.M., VIER, B.P. & GOMES, M.L. **Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report.** , 51 (5), 295-298, 2009.

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

KNOW, Y.B., LEE, H.J., HAN, H.J., MAR, W.C., KANG, S.K., BEITZ, A.J. & LEE, J.H. **Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nonieptive responses.** Pain, 90, 271-280, 2001.

KÖBERLE, F. **Patogênese dos “megas”.** Rev. Goiana. Med.,2, 101-110, 1956.

KOH, D.C.I., ARMUGAM, A. & JEYASEELAN, K. **Snake venom components and their applications in biomedicine.** Cell. Mol. Life Sci., 63, 3030-3041, 2006.

KOHL, L. & GULL, K. **Molecular architecture of *Trypanosoma* cytoskeleton.** Mol. Biochem. Parasitol., 93, 1-9, 1998.

KOMORI, Y., NIKAI, T., SEKIDO, C., FUWA, M. & SUGIHARA, H. **Biochemical characterization of hemorrhagic toxin from *Crotalus viridis viridis* (prairie rattlesnake) venom.** Int. J. Biochem., 26 (12), 1411-1418, 1994.

KOMORI, Y., NIKAI, T. & SUGIHARA, H. **Biochemical and physiological studies on a kallikrein-like enzyme from the venom of *Crotalus viridis viridis* (prairie rattlesnake).** Biochim. Biophys. Acta., 967 (1), 92-102, 1988.

KOSSUGA, M.H., NASCIMENTO, A.M., REIMÃO, J.Q., TEMPONE, A.G., TANIWAKI, N.N., VELOSO, K., FERREIRA, A.G., CAVALCANTI, B.C., PESSOA, C., MORAES, M.O., MAYER, A.M., HAJDU, E. & BERLINCK, R.G. **Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil.** J. Nat. Prod. 71, 334-339, 2008.

LA FORGIA, M.P., PELLERANO, G., DE LAS MERCEDES PORTALUPPI, M., KIEN, M.C. & CHOUELA, E.N. **Cutaneous manifestation of reactivation of Chagas disease in a renal transplant patient: long-term follow-up.** Arch. Dermatol., 139, 104-105, 2003.

LAEMMLIS, U.K. **Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 277, 680-685, 1970.

LAMAS, M.C., VILLAGGI, L., NOCITO, I., BASSANI, G., LEONARDI, D., PASCUTTI, F., SERRA, E. & SALOMÓN, C.J. **Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole.** Int. J. Pharm., 307 (2), 239-243, 2006.

LAZARDI, K., URBINA, J.A. & DE SOUZA, W. **Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.** Antimicrob. Agents Chemother., 34, 2097-2105, 1990.

LEE J.D., KIM, T.W., LEE, S.H., YANG, H.J., LEE, D.J. & LEE, Y.H. **Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis.** Am. J. Chin. Med., 32, 361-367, 2004.

LEIGUARDA, R., RONCORONI, A., TATATURO, A.L., JOST, L., BERTHIER, M., NOGUES, M. & FREILIG, H. **Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* Chagas' disease in immunosuppressed patients.** Neurology, 40, 850-851, 1990.

LENT, H. & WYGODZINKY, P. **Revision of the Triatominae Hemiptera, Reduviidae and their significance as vectors of Chagas' disease.** Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 163, 123-520, 1979.

LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. **A newly revised classification of the protozoa.** J. Protozool., 27 (1), 37-58, 1980.

LEWINSOHN, R. **Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I).** J. UNICAMP, 11 a 17 de abril, 2005a.

LEWINSOHN, R. **Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte II).** J. UNICAMP, 9 a 15 de maio, 2005b.

LEWINSOHN, R. **Doença de Chagas: paradoxos e ilações ComCiência** [online]. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/11.shtml>, 2005c.

LI, B., GU, W., ZHANG, C., HUANG, X.Q., HAN, K.Q. & LING, C.Q. **Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melitin.** Onkologie, 29, 367-371, 2006.

LI, Q., COLBERG, T.R. & OWNBY, C.L. **Purification and characterization of two high molecular weight hemorrhagic toxins from *Crotalus viridis viridis* venom using monoclonal antibodies.** Toxicon, 31 (6), 711-722, 1993.

LIENDO, A., LAZARDI, K. & URBINA, J.A. **In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*.** J. Antimicrob. Chemother., 41 (2), 197-205, 1998.

LIRA, R., CONTRERAS, L.M., SANTA-RITA, R.M. & URBINA, J.A. **Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole.** J. Antimicrob. Chemother., 47, 537-546, 2001.

LIU, B., LIU, Y., MOTYKA, S.A., AGBO, E.E. & ENGLUND, P.T. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** Trends Parasitol., 21 (8), 363-369, 2005.

LIU, C.Z., PENG, H.C. & HUANG, T.F. **Crotavirin, a potent platelet aggregation inhibitor purified from the venom of the snake *Crotalus viridis*.** Toxicon, 33 (10), 1289-1298, 1995.

LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J.M. **A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo).** Toxicon, 27 (7), 725-733, 1989.

LOPES, E.R. & CHAPADEIRO, E. **Anatomia patológica da doença de Chagas humana** In: Dias & Coura, orgs. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ; p. 67-81, 1997.

LUIZE, P.S., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., CORTEZ, D.A., MORGADO-DÍAZ, J.A., DE SOUZA, W. & NAKAMURA, C.V. **Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.** Parasitol. Res., 100, 31-7, 2006.

LUQUE-ORTEGA, J.R., SAUGAR, J.M., CHIVA, C., ANDREU, D. & RIVAS, L. **Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP.** *Biochem. J.*, 375, 221-230, 2003.

MACEDO, V.O. **Forma indeterminada da doença de Chagas** *In: Dias & Coura, orgs. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 383-409, 1997.

MADALOSSO, G., PELLINI, A.C., VASCONCELOS, M.J., RIBEIRO, A.F., WEISSMANN, L., OLIVEIRA FILHO, G.S., PENALVA DE OLIVEIRA, A.C. & VIDAL, J.E. **Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 46 (4), 199-202, 2004.

MAI, J.C., MI, Z., KIM, S.-H., NG, B. & ROBBINS, P.D. **A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumours.** *Cancer Res.*, 61, 7709-7712, 2001.

MACKESSY, S.P. **Evolutionary trends in venom composition in the western rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): toxicity vs. tenderizers.** *Toxicon*, 55 (8), 1463-1474, 2010.

MANGONI, M.L., SAUGAR, J.M., DELLISANTI, M., BARRA, D., SIMMACO, M. & RIVAS, L. **Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity.** *J Biol Chem.*, 14, 280 (2), 984-990, 2005.

MARCHESINI, N., LUO, S., RODRIGUES, C.O., MORENO, S.N. & DOCAMPO, R. **Acidocalcisomes and a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in malaria parasites.** *Biochem. J.*, 347, 243-253, 2000.

MARINETTI, G.V. **The action of phospholipase A on lipoproteins.** *Biochim. Biophys. Acta* 98, 554-565, 1965.

MARTIN, M.B., GRIMLEY, J.S., LEWIS, J.C., HEATH, H.T., BAILEY, B.N., KENDRICK, H., YARDLEY, V., CALDERA, A., LIRA, R., URBINA, J.A., MORENO, S.N., DOCAMPO, R., CROFT, S.L. & OLDFIELD, E. **Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy.** *J. Med. Chem.*, 44 (6), 909-916, 2001.

MARTÍNEZ-PALOMO, A., DE SOUZA, W. & GONZALEZ-ROBLES, A. **Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*.** *J. Cell Biol.*, 69 (2), 507-513, 1976.

MASSENSINI, A.R. **Neurotoxins acting on ion channels as therapeutic agents.** XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Hotel Glória, Caxambu. XLVIIIp, 2003.

MATHIS, A.M., HOLMAN, J.L., STURK, L.M., ISMAIL, M.A., BOYKIN, D.W., TIDWELL, R.R. & HALL, J.E. **Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and Db820 in African trypanosomes.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 2185-2191, 2006.

- MATSUNAGA, Y., YAMAZAKI, Y., HYODO, F., SUGIYAMA, Y., NOZAKI, M. & MORITA, T. **Structural divergence of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms.** J. Biochem., 145 (3), 365-375, 2009.
- MAZZA, S., MONTANA, A., BENITEZ, C. & JANZI, E. **Transmisión del Schizotripanum cruzi al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas.** MEPRA, 28, 41-49, 1936.
- MCGWIRE, B.S., OLSON, C.L., TACK, B.F. & ENGMAN, D.M. **Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides.** J. Infect. Dis., 188, 146-152, 2003.
- MCINTOSH, M.T. & VAIDYA, A.B. **Vacuolar type H<sup>+</sup> pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa.** Int. J. Parasitol., 32, 1-14, 2002.
- MEBS, D. & OWNBY, C.L. **Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities.** Pharm. Ther., 48, 223-236, 1990.
- MEIRELLES, M.N.L. & DE SOUZA, W. **Trypanosoma cruzi: Ultrastructural cytochemistry of mitochondrial enzymes.** Exp. Parasitol., 81, 373-381, 1980.
- MELO P.A., NASCIMENTO, M.C., MORS, W.B. & SUAREZ-KURTZ, G. **Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by Eclipta próstata (Asteraceae) extracts and constituents.** Toxicon, 32, 595-603, 1994.
- MELO P.A. & OWNBY, C.L. **Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins.** Toxicon, 34, 653-669, 1996.
- MELO P.A. & OWNBY, C.L. **Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins.** Toxicon, 37, 199-215, 1999.
- MENEZES, D., VALENTIM, C., OLIVEIRA, M.F. & VANNIER-SANTOS, M.A. **Putrescine analogue cytotoxicity against Trypanosoma cruzi.** Parasitol. Res., 98, 99-105, 2006.
- MENEZES, M.C., FURTADO, M.F., TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R., CAMARGO, A.C. & SERRANO, S.M. **Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings.** Toxicon, 47 (3), 304-312, 2006.
- MENNA-BARRETO, R.F., CORRÊA, J.R., CASCABULHO, C.M., FERNANDES, M.C., PINTO, A.V., SOARES, M.J. & DE CASTRO, S.L. **Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in Trypanosoma cruzi.** Parasitol., 136, 499-510, 2009b.
- MENNA-BARRETO, R.F.S., HENRIQUES-PONS, A., PINTO, A.V., MORGADO-DIAZ, J.A., SOARES, M.J. & DE CASTRO, S.L. **Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on Trypanosoma cruzi: identification of target organelles.** J. Antimicrob. Chemother., 56, 1034-1041, 2005.
- MENNA-BARRETO, R.F.S., LARANJA, G.A.T., SILVA, M.C.C., COELHO, M.G.P., PAES, M.C., OLIVEIRA, M.M. & DE CASTRO, S.L. **Anti-Trypanosoma cruzi activity of Pterodon pubescens seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component.** Parasitol. Res., 103, 111-117, 2008.

MENNA-BARRETO, R.F.S., SALOMÃO, K., DANTAS, A.P., SANTA-RITA, R.M., SOARES, M.J., BARBOSA, H.S. & DE CASTRO, S.L. **Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study.** *Micron*, 40, 157-168, 2009a.

MEYER, H. & DE SOUZA, W. **Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of peripheral microtubules in the various forms of parasites life cycle.** *J. Protozool.*, 23, 385-390, 1976.

MILEI, J., MANTNER, B., STORINO, R., SÁNCHEZ, J.A. & FERRANS, V.J. **Does Chagas disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States.** *Am. Heart J.*, 123, 1732-1735, 1992.

MILEI, J., GUERRI-GUTTENBERG, R.A., GRANA, D.R. & STORINO, R. **Prognostic impact of Chagas disease in the United States.** *Am Heart J.*, 157 (1): 22-29, 2009.

MIRANDA, K., BENCHIMOL, M., DOCAMPO, R. & DE SOUZA, W. **The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitol. Res.*, 86, 373-384, 2000.

MITTAL, N., GUPTA, N., SAKSENA, S., GOYAL, N., ROY, U. & RASTOGI, A.K. **Protective effect of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*.** *Life Sci.*, 63, 1823-1834, 1998.

MOARES-SOUZA, H. **Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 94 (Suppl 1), 419-423, 1999.

MOCHCA-MORALES, J., MARTIN, B.M. & POSSANI, L.D. **Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom.** *Toxicon*, 28 (3), 299-309, 1990.

MONCAYO, A. **Chagas disease: Current Epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98, 577-591, 2003.

MONCAYO, A. & SILVEIRA, A.C. **Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 17-30, 2009.

MONTEVERDE, D.A., TARATUTO, A.L. & LUCATELLI, N. **Meningoencefalite chagásica aguda en pacientes inmunosuprimidos.** *Ver. Neur. Arg.*, 2, 260-266, 1976.

MOON, D.O., PARK, S.Y., HEO, M.S., KIM, K.C., PARK, C., KO, W.S., CHOI, Y.H. & KIM, G.Y. **Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cell through downregulation of ERK and Akt.** *Int. Immunopharmacol.*, 6, 1796- 1807, 2006.

MORAES-SOUZA, H. **Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1, 419-423, 1999.

MOREIRA, D., LÓPEZ-GARCÍA, P. & VICKERMAN, K. **An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup:**

**proposal for a new classification of the class Kinetoplastea.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 861-1875, 2004.

MORELLO, A. **The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*.** Comp. Biochem. Physiol., 90C:1-12, 1988.

MORENO, S.N.J., DOCAMPO, R., MASON, R.P., LEON, W. & STOPPANI, A.O.M. **Different behaviour of benznidazol as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations.** Arch. Biochem. Biophys., 218, 585-591, 1982.

MORTARA, R.A., ANDREOLI, W.K., TANIWAKI, N.N., FERNANDES, A.B., SILVA, C.V., FERNANDES, M.C., L'ABBATE, C. & SILVA, S. **Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms.** An. Acad. Bras. Cienc., 77, 77-94, 2005.

MOYA, P.R. & MORETTI, E.R.A. **Doença de Chagas congênita.** In: Dias & Coura, orgs. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 383-410, 1997.

NASCIMENTO, A.C., FONTES, W., SEBEN, A. & CASTRO, M.S. **Antimicrobial peptides from anurans skin secretions.** Prot. Peptides Lett., 10, 227-238, 2003.

NEDELKOV, D. & BIEBER, A.L. **Characterization of the two myotoxin a isomers from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) by capillary zone electrophoresis and fluorescence quenching studies.** Toxicon, 35 (5), 689-698, 1997.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. & SNADER, K.M. **Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002.** J. Nat. Prod., 66, 1022-1237, 2003.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. & SNADER, K.M. **The influence of natural products upon drug discovery.** Nat. Prod. Rep., 17, 215-234, 2000.

NEWMAN, R.A., VIDAL, J.C., VISKATIS, L.J., JOHNSON, J. & ETCHEVERRY, M.A. **VRCTC-310-1 novel compound of purified animal toxins separated anti tumor efficacy from neurotoxicity.** Investig. New Drugs., 11, 151-159, 1993.

NISHIOKA SDE, A., FERREIRA, M.S., ROCHA, A., BURGARELLI, M.K., SILVA, A.M., DUARTE, M.I. & SCHMITT, F.C. **Reactivation of Chagas' disease successfully treated with benznidazole in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 88 (3), 493-496, 1993.

NÓBREGA, A.A., GARCIA, M.H., TATTO, E., OBARA, M.T., COSTA, E., SOBEL, J. & ARAUJO, W.N. **Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil.** Emerg Infect Dis., 15 (4), 653-655, 2009.

NÚÑEZ, V., CID, P., SANZ, L., DE LA TORRE, P., ANGULO, Y., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. & CALVETE, J.J. **Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism.** J. Proteomics., 73 (1), 57-78, 2009.

ODDÓ, D., CASANOVA, M., ACUNA, G., BALESTEROS, J. & MORELAES, B. **Acute Chagas' disease (American Trypanosomiasis) in acquired immunodeficiency syndrome: Report of two cases.** *Human Pathol.*, 23, 41-44, 1992.

OLIVEIRA, V.C.S., MOURA, D.M.S., LOPES, J.A.D., ANDRADE, P.P., DA SILVA, N.H. & FIGUEIREDO, R.C.B.Q. **Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L., on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes.** *Parasitol. Res.*, 104, 1053-1059, 2009.

ORSOLIC, N., SVET, L., VERSTOVSEK, S., TERZIC, S. & BASIC, I. **Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom.** *Toxicon*, 41, 861- 870, 2003.

OSIPOV, A.V., LEVASHOV, M.Y., TSETLIN, V.I. & UTKIN, Y.N. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 328 (1),177-182, 2005.

OWNBY, C.L., CAMERON, D. & TU, A.T. **Isolation of Myotoxic Component from Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom.** *Am. J. Pathol.*, 85 (1) 149-164, 1976.

OWNBY, C.L., COLBERG, T.R. & LI, Q. **Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms.** *Toxicon*, 32 (8), 945-954, 1994.

OWNBY, C.L., COLBERG, T.R. & WHITE, S.P. **Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*).** *Toxicon*, 35, 111-124, 1997.

PAI, L.H., WITTES, R., SETSER, A., WILLINGHAM, M.C. & PASTAN, I. **Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: on antibody linked to pseudomonas exotoxin.** *Nat. Med.* 2, 350-353, 1996.

PAPO, N., BRAUNSTEIN, A., ESHHAR, Z. & SHAI, Y. **Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D, L-amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion.** *Cancer Res.*, 64, 5779-5786, 2004.

PAPO, N. & SHAI, Y. **New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells.** *Biochem.*, 42, 9346–9354, 2003.

PARSONS, M. **Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose.** *Mol Microbiol.*, 53 (3): 717-724, 2004.

PASSERO, L.F.D., TOMOKANE, T.Y., CORBETT, C.E.P., LAURENTI, M.D. & TOYAMA, M.H. **Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms.** *Parasitol. Res.*, 101 (5), 1365-1371, 2007.

PAULIN, J.J. **The chondriome of selected trypanosomatids. A three dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy.** *J. Cell. Biol.*, 66, 404-413, 1975.

PEICHOTO, M.E., MACKESSY, S.P., TEIBLER, P., TAVARES, F.L., BURCKHARDT, P.L., BRENO, M.C., ACOSTA, O. & SANTORO, M.L. **Purification and characterization of a cysteine-rich secretory protein from *Philodryas patagoniensis* snake venom.** Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 150 (1), 79-84, 2009.

PINAZO, M.-J., ESPINOSA, G., GÁLLEGO, M., LÓPEZ-CHEJADE, P., URBINA, J. & GASCON, J. **Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus.** Am. J. Trop. Med. Hyg., In Press, 2010.

PINTO DIAS, J.C. & COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral,** FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 486 p, 1997.

PINTO DIAS, J.C. **Chagas' disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and Clinical Medicine.** Wendel, Brener, Camargo & Rassi (eds) ISBT, SP, Brasil, 49-80, 1992.

PINTO DIAS, J.C. **Doença de Chagas: Clínica e Terapêutica.** SUCAM, Ministério da Saúde, p. 94, 1990.

PINTO DIAS, J.C., SILVEIRA, A.C. & SCHOFIELD, C.J. **The impact of Chagas disease control in Latin America: A review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97, 603-612, 2002.

PIZZI, T., CROIZET, V.A., SMOK, G. & DIAS, M. **Chagas' disease in a patient with renal transplantation and immunosuppressive treatment.** Rev. Med. Chile, 110, 1207-1211, 1982.

PLOCK, A., SOKOLOWSKA-KOHLER, W. & PRESBER, W. **Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp.** Exp. Parasitol., 97, 141-153, 2001.

POLAK, A. & RICHLE, R. **Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole.** Ann. Trop. Méd. Parasitol., 72, 228-232, 1978.

PUNUKOLLU, G., GOWDA, R.M., KHAN, I.A., NAVARRO, V.S. & VASAVADA, B.C. **Clinical aspects of the Chagas' heart disease.** Int. J. Cardiol., 115 (3), 279-283, 2007.

PUTZ, T., RAMONER, R., GANDER, H., RAHM, A., BARTSCHA, G., BERNARDO, K., RAMSAY, S. & THURNHER, M. **Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells.** Cancer Immunol. Immunother., 56, 627-640, 2007.

RAGHURAMAN, H. & CHATTOPADHYAY, A. **Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions.** Biosci. Rep., 27, 189-223, 2007.

- RASSI, A. **Tratamento etiológico da doença de Chagas.** Arq. Bras. Cardiol., 38, 277-281, 1982.
- RENSLO, A.R. & MCKERROW, J.H. **Drug discovery and development for neglected parasitic diseases.** Nat. Chem. Biol., 2 (12), 701-710, 2006.
- REZENDE, J.M. **The digestive tract in Chagas' disease.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 79 (suppl),97-106, 1984.
- RIBEIRO, A.L.P. & ROCHA, M.O.C. **Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 31, 301-314, 1998.
- RIOU, G.F., GABILLOT, M., DOUC-RASSY, S. & KAYSER, A.W. **DNA topoisomerase(s) of trypanosomes: inhibitory effect of some chemicals** In: Agabian E, org. *Molecular biology of host-parasites interactions.* New York: A R Less, p. 279-89, 1984.
- RISSO, A., BRAIDOT, E., SORDANO, M.C., VIANELLO, A., MACRI, F., SKERLAVAJ, B., ZANETTI, M., GENNARO, R. & BERNARDI, P. **BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore.** Mol. Cell Biol., 22, 1926-1935, 2002.
- RIVAROLA, H.W. & PAGLINI-OLIVA, P.A. **Trypanosoma cruzi trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution.** Curr. Drug Targets Cardiovasc. Disord., 2 (1), 43-52, 2002.
- RIVAS, L., LUQUE-ORTEGA, J.R. & ANDREU, D., **Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: Lessons from parasites.** Biochim. Biophys. Acta, 1788 (8), 1570-1581, 2009.
- RIZZO, M.T., NGUYEN, E., ALDO-BENSON, M. & LAMBEAU, G. **Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration.** Blood, 96, 3809-3815, 2000.
- ROBERTS, K.P., JOHNSTON, D.S., NOLAN, M.A., WOOTERS JL, WAXMONSKY, N.C., PIEHL, L.B., ENSRUD-BOWLIN, K.M. & HAMILTON, D.W. **Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1.** Asian. J. Androl., 9 (4), 508-514, 2007.
- ROCHA. G.M., BRANDÃO, B.A., MORTARA, R.A., ATTIAS, M., DE SOUZA, W. & CARVALHO, T.M.U. **The flagellar attachment zone of Trypanosoma cruzi epimastigote forms.** J. Struct. Biol., 154, 89-99, 2006.
- RODRIGUES, J.C. & DE SOUZA, W. **Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors.** Curr. Pharm. Des., 14, 925-938, 2008.
- ROELLIG, D.M., ELLIS, A.E. & YABSLEY, M.J. **Oral transmission of Trypanosoma cruzi with opposing evidence for the theory of carnivory.** J. Parasitol., 95 (2), 360-364, 2009.

ROSEMBERG, S., CHAVES, C.J., HIGUCHI, M.L., LOPES, M.B.S., CASTRO, L.H.M. & MACHADO, L.R. **Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS.** *Neurology*, 42, 640-642, 1992.

ROUAULT, M., RASH, L.D., ESCOUBAS, P., BOILARD, E., BOLLINGER, J., LOMONTE, B., MAURIN, T., GUILLAUME, C., CANAAN, S., DEREGNAUCOURT, C., SCHRÉVEL, J., DOGLIO, A., GUTIÉRREZ, J.M., LAZDUNSKI, M., GELB, M.H. & LAMBEAU, G. **Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity.** *Biochem.*, 45 (18), 5800-5816, 2006.

RUFINI, S., CESARONI, M.P., BALESTRO, N. & LULY, P. **Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture.** *Biochem. J.*, 320, 467-472, 1996.

RUIZ-MORENO, L., BIJOVSKY, T. A., PUDLES, J., ALVES, J.J.M. & COLLI, W. ***Trypanosoma cruzi*: Monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone.** *Exp. Parasitol.*, 80, 605-615, 1995.

SABINO, E.C., GONCALEZ, T.T., SALLES, N.A., SILVA, G.R. & CHAMONE, D.F. **Trends in the prevalence of Chagas' disease among first-time blood donors in São Paulo, Brazil.** *Transfusion*, 43,853-856, 2003.

SALOMÃO, K., DE SOUZA, E.M., HENRIQUES-PONS, A., BARBOSA, H.S. & DE CASTRO, S.L. **Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*.** *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, In Press, 2009.

SANTAMARÍA, C., LARIOS, S., ÂNGULO, Y., PIZARRO-CERDA, J., GORVEL, J.P., MORENO, E. & LOMONTE, B. **Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region.** *Toxicon*, 45, 807-815, 2005.

SANT'ANNA, C., DE SOUZA, W. & CUNHA-E-SILVA, N. **Biogenesis of the Reservosomes of *Trypanosoma cruzi*.** *Microsc. Microanal.*, 10, 637-646, 2004.

SANT'ANNA, C., PARUSSINI, F., LOURENÇO, D., DE SOUZA, W., CAZZULO, J.J. & CUNHA-E-SILVA, N. **All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles.** *Histochem. Cell. Biol.*, 130, 1187-1198, 2008.

SANTA-RITA, R.M., BARBOSA, H.S. & DE CASTRO, S.L. **Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitol. Res.*, 100, 187-190, 2006.

SANTA-RITA, R.M., LIRA, R., BARBOSA, H.S., URBINAM J.A & DE CASTRO, S.L. **Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 55, 780-784, 2005.

SANTA-RITA, R.M., BARBOSA, S.H., MEIRELLES, M.N. & DE CASTRO, S.L. **Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** *Acta Trop.*, 75 (2), 219-228, 2000.

SANTORO, G.F., CARDOSO, M.G., GUIMARÃES, L.G., SALGADO, A.P., MENNA-BARRETO, R.F. & SOARES, M.J. **Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and**

**thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure.** Parasitol. Res., 100, 783-790, 2007a.

SANTORO, G.F., CARDOSO, M.G., GUIMARÃES, L.G.L., MENDONÇA, L.Z. & SOARES, M.J. ***Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes.** Exp. Parasitol., 116, 283-290, 2007b.

SARAIVA, V.B., GIBALDI, D., PREVIATO, J.O., MENDONÇA-PREVIATO, L., BOZZA, M.T., FREIRE-DE-LIMA C. G. & HEISE, N. **Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) against Drug-Resistant Strains of *Trypanosoma cruzi*.** Antimicrob. Agents Chemother., 46 (11), 3472-3477, 2003.

SARTORI, A.M., CAIAFFA-FILHO, H.H., BEZERRA, R.C., DO S GUILHERME, C., LOPES, M.H. & SHIKANAI-YASUDA, M.A. **Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 67, 521-523, 2002.

SARTORI, A.M., LOPES, M.H., CARAMELLI, B., DUARTE, M.I., PINTO, P.L., NETO, V. & SHIKANAI-YASUDA, M.A. **Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS.** Clin. Infect. Dis., 21, 1297-1299, 1995.

SARTORI, A.M., SHIKANAI-YASUDA, M.A., AMATO NETO, V. & LOPES, M.H. **Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients.** Clin. Infect. Dis., 26, 177-179, 1998.

SARTORI, A.M., SOTTO, M.N., BRAZ, L.M., OLIVEIRA JUNIOR ODA, C., PATZINA, R.A., BARONE, A.A. & SHIKANAI-YASUDA, M.A. **Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 93, 631-632, 1999.

SCARBOROUGH, R.M., ROSE, J.W., NAUGHTON, M.A., PHILLIPS, D.R., NANNIZZI, L., ARFSTEN, A., CAMPBELL, A.M. & CHARO, I.F. **Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms.** J. Biol. Chem., 268 (2), 1058-1065, 1993.

SCHMIDT, A. & KRAUTH-SIEGEL, R.L. **Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development.** Curr. Top. Med. Chem., 2 (11), 1239-1259, 2002.

SCHMUNIS, G.A. **The globalization of Chagas disease.** ISBT Sci. Ser., 2, 6-11, 2007.

SCHMUNIS, G.A. & CRUZ, J.R. **Safety of the Blood Supply in Latin America.** Clin. Microbiol. Rev., 18 (1), 12-29, 2005.

SCHMUNIS, G.A. & YADON, Z.E. **Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem.** Acta Trop., In Press, 2009.

SCHMUNIS, G.A., ZICKER, F., CRUZ, J.R. & CUCHI, P. **Safety of blood supply for infectious diseases in Latin American countries, 1994-1997.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 65 (6), 924-930, 2001.

SCHOFIELD, C.J. & PINTO DIAS, J.C. **The Southern Cone initiative against Chagas disease.** Adv. Parasitol. 42,1-27, 1999.

SCOTT, D.A., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M., ZHONG, L., LU, H.G., MORENO, S.N. & DOCAMPO, R. **Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*.** J. Biol. Chem., 273, 22151-22158, 1998.

SCOTT, D.A., DOCAMPO, R., DVORAK, J.A., SHI, S. & LEAPMAN, R.D. **In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*.** J. Biol. Chem., 272, 28020-28029, 1997.

SCOTT, D.A., MORENO, S.N. & DOCAMPO, R. **Ca<sup>2+</sup> storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity.** Biochem. J., 310, 789-794, 1995.

SHAPIRO, T.A. & ENGLUND, P.T. **The structure and replication of kinetoplast DNA.** Annu. Rev. Microbiol., 49,117-143, 1995.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O. & MANN, M. **Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-strained polyacrylamide gels.** Anal. Chem., 68, 850-858, 1996.

SHIKANAI YASUDA, M.A., MARCONDES, C.B., GUEDES, L.A., SIQUEIRA, G.S., BARONE, A.A., DIAS, J.C., AMATO NETO, V., TOLEZANO, J.E., PERES, B.A. & ARRUDA JÚNIOR, E.R. **Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil.** Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo, 33, 351-357, 1991.

SILVA, A.E., SILVA, A.C., FALEIROS, A.C., GUIMARÃES, C.S., CORRÊA, R.R., OLIVEIRA, F.A., CORREIA, D., TEIXEIRA, A.C., RAMIREZ, L.E., TEIXEIRA, V.P., DOS REIS & M.A. **Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benzonidazole.** Ann. Diagn. Pathol., 14 (3), 199-203, 2010.

SILVA, C.F., BATISTA, M.M., BATISTA, D.G., DE SOUZA, E.M., SILVA, P.B., OLIVEIRA, G.M., MEUSER, A.S., SHAREEF, A.R., BOYKIN, D.W. & SOEIRO, M.N.C. **In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*.** Antimicrob. Agents Chemother., 52, 3307-3314, 2008.

SILVA, C.F., BATISTA, M.M., DE SOUZA, E.M., MEIRELLES, M.N.L., STEPHENS, C.E., SOM, P., BOYKIN, D.W. & SOEIRO, M. **Cellular Effects of Reversed Amidines on *Trypanosoma cruzi*.** Antimicrob. Agents Chemother., 51, 3803-3809, 2007a.

SILVA, C.F., BATISTA, M.M., MOTA, R.A., DE SOUZA, E.M., STEPHENS, C.E., SOM, P., BOYKIN, D.W. & SOEIRO, M.N.C. **Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "in vitro".** Biochem. Pharmacol., 73, 1939-1946, 2007b.

SILVEIRA, C.A.N., CASTILLO, E. & CASTRO, C. **Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada.** Rev. Soc. Bras. Méd. Trop., 33 (2),191-196, 2000.

SKOLNICK, A. **Does influx from endemic areas mean more transfusion associated Chagas disease?** JAMA, 262, 1433, 1989.

SOARES, M.J. **The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94 (Suppl 1), 139-141, 1999.

SOARES, M.J. & DE SOUZA, W. **Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study.** J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 20, 349-361, 1988.

SOARES, M.J. & DE SOUZA, W. **Endocytosis of gold-labeled and LDL by *Trypanosoma cruzi*.** Parasitol. Res., 77, 461-468, 1991.

SOARES, M.J., SOUTO-PADRÓN, T., BONALDO, M.C., GOLDENBERG, S. & DE SOUZA, W. **A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*.** Parasitol. Res., 75, 522-527, 1989.

SOARES, M.J., SOUTO-PADRÓN, T. & DE SOUZA, W. **Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*.** J. Cell. Sci., 102, 157-167, 1992.

SOBALLE, P.W., MALOY, W.L., ZASLOFF, M. & JACOB, L.S. **Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides.** Int. J. Cancer, 60, 280-284, 1995.

SOEIRO, M.N.C. & DE CASTRO, S.L. ***Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches.** Expert. Opin. Ther. Targets, 13, 105-121, 2009.

SOEIRO, M.N.C., DE CASTRO, S.L., DE SOUZA, E.M., BATISTA, D.G., SILVA, C.F. & BOYKIN, D.W. **Diamidine activity against trypanosomes: the state of the art.** Curr. Mol. Pharmacol., 1 (2), 151-161, 2008.

SOLARI, A., SAAVEDRA, H., SEPÚLVEDA, C., ODDÓ, D., ACUÑA, G., LABARCA, J., MUÑOZ, S., CUNY, G., BRENGUES, C., VEAS, F. & BRYAN, R.T. **Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS.** Clin. Infect. Dis., 16 (2), 255-259, 1993.

SOSA ESTANI, S., SEGURA, E.L., RUIZ, A.M., VELAZQUEZ, E., PORCEL, B.M. & YAMPOTIS, C. **Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 59, 526-529, 1998.

SOUZA, F.F., CASTRO-E-SILVA, O., MARIN NETO, J.A., SANKARANKUTTY, A.K., TEIXEIRA, A.C., MARTINELLI, A.L., GASPAR, G.G., MELO, L., FIGUEIREDO, J.F., ROMANO, M.M., MACIEL, B.C., PASSOS, A.D. & ROSSI, M.A. **Acute chagasic myocardiopathy after orthotopic liver transplantation with donor and recipient serologically negative for *Trypanosoma cruzi*: a case report.** Transplant. Proc., 40 (3), 875-878, 2008.

STEINDEL, M., PACHECO, L.K., SCHOLL, D., SOARES, M., MORAES, M.H., EGER, I., KOSMANN, C., SINCERO, T.C.M., STOCO, P.H., MURTA, S.M.F., CARVALHO-PINTO, C.J., GRISARD, E.C. **Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 60, 25-32, 2008.

STEVERDING, D. & TYLER, K.M. **Novel antitrypanosomal agents.** *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 14 (8), 939-955, 2005.

STOCKER, K. Use of snake venom proteins in medicine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, 129 (6), 205-216, 1999.

SUZUKI, M., ITOH, I.K., BANDARANAYAKE, B.M., RANASINGHE, J.G., ATHAUDA, S.B. & MORIYAMA, A. **Molecular diversity in venom proteins of the Russell's viper (*Daboia russellii russellii*) and the Indian cobra (*Naja naja*) in Sri Lanka.** *Biomed. Res.*, 31 (1), 71-81, 2010.

TEMPONE, A.G., ANDRADE, H.F.JR., SPENCER, P.J., LOURENCO, C.O., ROGERO J.R. & NASCIMENTO, N. ***Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 620-624, 2001.

TEMPONE, A.G., SARTORELLI, P., MADY, C. & FERNANDES, F. **Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis.** *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 5 (3), 222-235, 2007.

THEAKSTON, R.D.G. & KAMIGUTI, A.S. **A list of animal toxins and some other natural products with biological activity.** *Toxicon*, 40, 579-651, 2002.

THOMAS, S.M. & MCPHEE, D.G. **Crystal violet: A direct- acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism.** *Mutation Res.*, 140, 1165-1167, 1984.

THOMAS, R.G. & POUGH, F.H. **The effect of rattlesnake venom on digestion of prey.** *Toxicon*, 17 (3), 221-228, 1979.

TOMIMOROI-YAMASHITA, J., DEPS, P.D., ALMEIDA, D.R., ENOKIHARA, M.M., DE SEIXAS, M.T. & FREYMÜLLER, E. **Cutaneous manifestation of Chagas' disease after heart transplantation: successful treatment with allopurinol.** *Br. J. Dermatol.*, 137 (4), 626-630, 1997.

TORRES-SANTOS, E.C., MOREIRA, D.L., KAPLAN, M.A., MEIRELLES, M.N. & ROSSI-BERGMANN, B. **Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 1234-1241, 1999.

TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., PASSERO, L.F., LAURENTI, M.D., CORBETT, C.E., TOMOKANE, T.Y., FONSECA, F.V., ANTUNES, E., JOAZEIRO, P.P., BERIAM, L.O., MARTINS, M.A., MONTEIRO, H.S. & FONTELES, M.C. **ISOLATION OF A NEW L-AMINO ACID OXIDASE FROM *CROTALUS DURISSUS CASCAVELLA* VENOM.** *TOXICON*, 47 (1), 47-57, 2006.

TROUILLER, P., OLLIARO, P., TORRELE, E., ORBINSKI, J., LAING, R. & FORD, N. **Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure.** *The Lancet*, 359, 2188-2194, 2002.

TSAI, I.H., WANG, Y.M., CHEN, Y.H. & TU, A.T. **Geographic variations, cloning, and functional analyses of the venom acidic phospholipases A<sub>2</sub> of *Crotalus viridis viridis***. Arch. Biochem. Biophys., 411(2), 289-296, 2003.

TU, A.T. **Overview of snake venom chemistry**. Adv.Exp. Med. Biol., 391:37-62, 1996.

URBÁN, E., NAGY, E., PÁL, T., SONNEVEND, A. & CONLON, J.M. **Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1 Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria**. Int. J. Antimicrob. Agents, 29, 317-321, 2007.

URBINA J.A., CONCEPCION, J.L., CALDERA, A., PAYARES, G., SANOJA, C., OTOMO, T. & HIYOSHI, H. **In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi***. Antimicrob. Agents Chemother., 48 (7), 2379-2387, 2004.

URBINA, J.A. & DOCAMPO, R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances**. Trends Parasitol., 19, 495-501, 2003.

URBINA, J.A. **Chemotherapy of Chagas disease: The how and the why**. J. Mol. Med., 77, 332-338, 1999.

URBINA, J.A. **Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 104 (supl.1), 311-318, 2009.

URBINA, J.A., PAYARES, G., SANOJA, C., MOLINA, J., LIRA, R., BRENER, Z. & ROMANHA, A.J. **Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains**. Int. J. Antimicrob. Agents., 21 (1), 39-48, 2003.

URBINA, J.A., VIVAS, J., LAZARDI, K., MOLINA, J., PAYARES, G., PIRAS, M.M. & PIRAS, R. **Antiproliferative effects of delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies**. Chemother., 42 (4), 294-307, 1996.

URBINA, J.A., VIVAS, J., VISBAL, G. & CONTRERAS, L.M. **Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole**. Mol. Biochem. Parasitol., 73 (1-2), 199-210, 1995.

UTKIN, Y.N. & OSIPOV, A.V. **Non-lethal polypeptide components in cobra venom**. Curr. Pharm. Des., 13 (28), 2906-2915, 2007.

VARON, D. & SPECTRE, G. **Antiplatelet agents**. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program., 267-272, 2009.

VINHAES, M.C. & SCHOFIELD, C.J. **Trypanosomiasis control: surmounting diminishing returns**. Trends Parasitol., 19, 112-113, 2003.

VIOTTI, R., VIGLIANO, C., ARMENTI, H. & SEGURA, E. **Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up**. Am. Heart J., 127, 151-162, 1994.

VIZIOLI, J. & SALZET, M. **Antimicrobial peptides versus parasitic infections?** *TRENDS Parasitol.*, 18 (11), 475-476, 2002.

WERBOVETZ, K. **Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents.** *Curr Opin Investig Drugs.* 7(2), 147-57, 2006.

WERMELINGER, L.S., DUTRA, D.L., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., SOARES, M.R., BLOCH, C. JR. & ZINGALI, R.B. **Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (12), 1703-1708, 2005.

WERTLIEB, D.M. & GUTTMAN, H.N. **Catalase in insect trypanosomatids.** *J Protozool.*, 10:109-112, 1963.

WILKINSON, S.R. & KELLY, J.M. **Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets.** *Exp. Rev. Mol. Med.*, 11 (e31), 1-23, 2009.

WILKINSON, S.R., PRATHALINGAM, S.R., TAYLOR, M.C., HORN, D. & KELLY, J.M. **Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 16; 102 (33): 11645-11650, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Chagas disease.** Thirteenth Programme Report UNDP/WB/TDR., Geneva. p. 112-123, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Control of Chagas Disease.** Tech. Rep. Series, 905, 1-109, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Control of Chagas' disease.** WHO Tech. Rep. Series, 811, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of of blood UNDP/WB/TDR.** Geneva, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Weekly Epidemiological Record,** Geneva, 1/2, 1-4, 1998.

YAMAZAKI, Y., HYODO, F. & MORITA, T. **Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 412 (1), 133-141, 2003.

YAMAZAKI, Y., KOIKE, H., SUGIYAMA, Y., MOTOYOSHI, K., WADA, T., HISHINUMA, S., MITA, M. & MORITA, T. **Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction.** *Eur. J. Biochem.*, 269 (11), 2708-2715, 2002.

YAMAZAKI, Y. & MORITA, T. **Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins.** *Toxicon*, 44 (3), 227-231, 2004.

YANG, F., LIM, G.P., BEGUM, A.N., UBEDA, O.J., SIMMONS, M.R., AMBEGAOKAR, S.S., CHEN P.P., KAYED, R., GLABE, C.G., FRAUTSCHY, S.A. & COLE, G.M. **Curcumin inhibits formation of amyloid- $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*.** *J. Biol. Chem.*, 280, 5892-5901, 2005.

ZHOU, Q., SHERWIN, R.P., PARRISH, C., RICHTERS, V., GROSHEN, S.G., TSAO-WEI, D. & MARKLAND, F.S. **Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression.** Breast Cancer Res., 61, 249-260, 2000.

ZIELER, H., KEISTER, D.B., DVORAK, J.A. & RIBEIRO, J.M.C. **A snake venom phospholipase A2 blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with midgut surface.** J. Exp. Biol., 204, 4157-4167, 2001.

ZINGALES, B. & COLLI, W. ***Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 117, 129-152, 1985.

## IX. ANEXOS

Durante o período de execução desta tese, foi submetido um artigo referente ao primeiro conjunto de resultados com o veneno bruto de Cvv. Este foi intitulado: “Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*”, aceito para publicação na revista Parasitology (**Anexo 1**).

Ainda relacionado ao tema quimioterapia direcionada ao tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos, também produzimos uma revisão intitulada: “Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs”, aceita para publicação no periódico The Open Parasitology Journal (**Anexo 2**).

Além destes, também participei da execução do trabalho publicado no formato de short communication no periódico International Journal of Antimicrobial Agents, 31 (2008) 282-286 (**Anexo 3**).

## Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*

CAMILA M. ADADE<sup>1</sup>, BRUNO LEMOS CONS<sup>2</sup>, PAULO A. MELO<sup>2</sup> and THAÍS SOUTO-PADRÓN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, bloco I, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia das Toxinas e Substâncias Antagonistas, Centro de Ciências da Saúde, bloco J, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil

(Received 22 March 2010; revised 19 May 2010; accepted 31 May 2010)

### SUMMARY

Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects 16–18 million people in Central and South America. Patient treatment is based on drugs that have toxic effects and limited efficacy. Therefore, new chemotherapeutic agents need to be developed. Snake venoms are sources of natural compounds used in various medical treatments. We observed that *Crotalus viridis viridis* venom was effective against all developmental forms of *T. cruzi*. Ultrastructural analysis revealed swelling of mitochondria, blebbing and disruption of the plasma membrane, loss of cytoplasm components and morphological changes of the cell. Staining with propidium iodide and rhodamine 123 confirmed the observed alterations in the plasma and mitochondrial membranes, respectively. The effects of the venom on the parasite intracellular cycle were also analysed. Pre-infected LLC-MK<sub>2</sub> cells incubated with *Crv* venom showed a 76–93% reduction in the number of parasites per infected cell and a 94–97.4% reduction in the number of parasites per 100 cells after 96 h of infection. Free trypomastigotes harvested from the supernatants of *Crv* venom-treated cells were incapable of initiating a new infection cycle. Our data demonstrate that *Crv* venom can access the host cell cytoplasm at concentrations that cause toxicity only to the amastigote forms of *T. cruzi*, and yields altered parasites with limited infective capacity, suggesting the potential use of *Crv* venom in Chagas' disease chemotherapy.

Key words: *Crotalus viridis viridis*, *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease chemotherapy, ultrastructure, snake venom.

### INTRODUCTION

*Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas' disease, which remains a major public health issue in Latin America where approximately 100 million people are at risk. Human hosts are naturally infected by the bite of the insect vector (Hemiptera: Reduviidae), but blood transfusion, congenital transmission and ingestion of contaminated food are also important mechanisms of infection (Moncayo and Silveira, 2009). The chronic phase of the disease mostly occurs several years after infection, and it is characterized by severe cardiac and gastrointestinal pathologies (Coura and De Castro, 2002). Treatment of chagasic patients relies on 2 nitroheterocyclic drugs that have several limitations due to their high toxicity and have minimal benefits during the chronic phase of the disease (Urbina and Docampo, 2003). These restrictions encourage the search for alternative synthetic or natural compounds that are effective

for both clinical treatment of Chagas disease and chemoprophylaxis in donated blood.

Animal venoms have been used in the treatment of a variety of pathophysiological conditions in Ayurveda, homeopathy and folk medicine. With the advent of biotechnology, the efficacy of such treatments has improved with the purification of venom components and the delineation of their therapeutic properties. Snake venoms are complex mixtures of proteins, nucleotides and inorganic ions (Koh *et al.* 2006) with a high degree of target specificity. They have been increasingly used as pharmacological tools and prototypes for drug development, including in cancer chemotherapy (Newman *et al.* 1993; Pai *et al.* 1996; Zhou *et al.* 2000; Corrêa Jr. *et al.* 2002; Papo and Shai, 2003; Papo *et al.* 2003, 2004; Araya and Lomonte, 2007; El-Rafael and Sarkar, 2009). One of these drugs, Captopril, is the first commercial inhibitor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) and is used for the treatment of human hypertension. This compound was developed from studies of *Bothrops jararaca* venom and its bradykinin-potentiating peptides (BPPs) (Fernandez *et al.* 2004).

Snake venom proteins have been used to kill HIV (Zhang *et al.* 2003), the protozoan parasites *Plasmodium falciparum* (Zieler *et al.* 2001) and

\* Corresponding author: Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, CCS, Bloco I, UFRJ, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel: +55 21 2562 6738. Fax: +5521 2560 8344. E-mail: souto.padron@micro.ufrj.br

*Leishmania* spp. (Fernandez-Gomez *et al.* 1994; Toyama *et al.* 2006; Tempone *et al.* 2007; Passero *et al.* 2007). Recent studies have revealed that the crude venom of South American *Bothrops* snakes inhibit the growth of *Leishmania major* promastigotes and *T. cruzi* epimastigotes (Gonçalves *et al.* 2002) and induce programmed cell death in *T. cruzi* (Deolindo *et al.* 2005). The L-amino acid oxidases are associated with the anti-protozoal activities observed in snake venoms of the *Bothrops* genera (Tempone *et al.* 2001; Ciscotto *et al.* 2009).

Other important snakes are those from the genus *Crotalus*, also known as rattlesnakes. Different species are present in the American continents, and *Crotalus durissus* and *C. viridis* are prevalent in South and North America, respectively (Tsai *et al.* 2003). The pathophysiological effects of *Crotalus* venoms are due to different enzymes and peptides that cause serious local effects such as oedema, haemorrhage and myonecrosis (Ownby *et al.* 1997).

Considering previous data obtained for other snake venoms against protozoa and the absence of a complete study investigating the activity of snake venoms during the entire *T. cruzi* cycle, we analysed the effect of *Crotalus viridis viridis* venom (Cvv venom) on the ultrastructure of all 3 developmental forms of this parasite and its effects on parasite intracellular development to investigate a possible target for its activity.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Parasites

*T. cruzi* epimastigotes of the CL-Brener clone were maintained at 28 °C by weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) (Camargo, 1964) medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Four-day-old culture forms at the mid-log phase of growth were used in all experiments. Tissue culture trypomastigotes were obtained from the supernatants of 5 to 6-day-old infected LLC-MK<sub>2</sub> cells maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 2% FCS at 37 °C in a 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere as previously described (Bisaggio *et al.* 2006).

##### Parasite treatment

The Cvv crude venom was purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). A stock solution was prepared at 50 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and stored at -20 °C until use. Epimastigotes were resuspended in LIT medium at 5 × 10<sup>6</sup> cells/ml, and a 1 ml aliquot of the suspension was added to the same volume of Cvv venom, which was previously diluted in LIT medium at twice the desired final concentration (0.25–500 µg/ml), in 24-well plates (Nunc Inc., Naperville, IL, USA). The samples were then incubated for 120 h at 28 °C.

The number of parasites was determined daily by counting formalin-fixed parasites using a Neubauer chamber. The LD<sub>50</sub>, which corresponds to the drug concentration that inhibits 50% of cell growth, was used to estimate inhibition of proliferation. Parasites grown in venom-free LIT medium were used as a control. The growth experiments were carried out in triplicate, and the standard deviations of the cell densities at each time-point are indicated by the error bars. Parasite viability was monitored based on motility and trypan blue exclusion using light microscopy. Parasite suspensions (10 µl) were diluted in trypan blue solution (0.4% in water) at a 1:1 volume ratio and monitored by direct counting of viable and non-viable parasites using a Neubauer chamber.

Tissue-culture trypomastigotes were resuspended to a concentration of 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml in RPMI medium (Sigma) containing 10% FCS. This suspension (100 µl) was added to the same volume of the venom that had been previously diluted in RPMI medium at twice the desired final concentration (the same procedure used for epimastigotes treatment) in 96-well plates (Nunc Inc.), following incubation at 37 °C for 24 h. The LD<sub>50</sub> (50% trypomastigote lysis) was then calculated by cell counting of formalin-fixed parasites using a Neubauer chamber. The experiments were performed in triplicate, and at least 3 independent experiments were conducted.

The determination of the LD<sub>50</sub> for intracellular amastigotes is described below in the *Mammalian cell invasion by tissue-culture trypomastigotes* section.

##### Effect of boiled Cvv venom on parasite growth

Cvv venom was boiled for 7.5, 15 and 30 min at 95 °C (as previously described by Fernandez-Gomez *et al.* 1994) and was used to challenge epimastigote forms (CL-Brener clone). Epimastigotes were resuspended in LIT medium at 5 × 10<sup>6</sup> cells/ml, incubated with 0.5 µg/ml (corresponding to the LD<sub>50</sub> previously obtained) of crude boiled and non-boiled (positive control) Cvv venom, and then incubated for 24, 48 and 72 h at 28 °C. The negative control consisted of parasites maintained in the same culture conditions but not exposed to venom. The number of parasites was determined daily by counting formalin-fixed parasites in a haemocytometer chamber as described previously.

##### Cvv venom cytotoxicity assay in non-infected LLC-MK<sub>2</sub> cells

Non-infected LLC-MK<sub>2</sub> cells were first submitted to Cvv venom treatment to determine the toxicity of the venom to host cells. Cells were seeded in 24-well plates containing glass cover-slips, cultivated in RPMI supplemented with 10% FCS, and then maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere

for 1 day as previously described (Bisaggio *et al.* 2008). After this period, the cultures were washed with PBS to remove non-adherent cells, cultivated in fresh RPMI medium containing 2% FCS and treated with 0.1, 10, 100 or 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Cvv venom for up to 120 h. Control cells were subjected to the same procedure excluding the exposure to Cvv venom. The culture media were changed every 48 h. Cover-slips were collected daily, rinsed in PBS, fixed in Bouin's solution, stained with Giemsa and mounted onto glass slides with Permount (Fisher Scientific, NJ, USA). The number of adhered cells and the morphological characteristics of the cells were analysed.

The same procedure was performed in parallel to allow for analysis by the trypan blue exclusion test. Cover-slips were stained with a 1:1 volume dilution of trypan blue solution:RPMI medium and were observed using a Zeiss Axiovert light microscope (Oberkochen, Germany).

#### *Mammalian cell invasion by tissue-culture trypomastigotes*

To investigate the effect of Cvv venom on the intracellular cycle of the parasite, LLC-MK<sub>2</sub> cells were seeded in 24-well plates as described above. Thereafter, the cultures were washed and infected with tissue culture trypomastigotes (parasite:host cell ratio of 10:1). After 24 h of interaction, non-internalized parasites were removed by repeated washing with PBS, and the cells were cultivated in fresh RPMI medium containing 2% FCS with (37.5–500 ng/ml) or without snake venom (control cells). The media were changed every 2 days. Cover-slips were collected daily up to 96 h, rinsed in PBS, fixed in Bouin's solution, stained with Giemsa and mounted onto glass slides with Permount (Fisher Scientific, NJ, USA). Parasite infection was quantified using a Zeiss Axioplan 2 light microscope (Oberkochen, Germany) equipped with a Color View XS digital video camera. The percentage of infected cells, the number of intracellular amastigotes per infected cell and the number of amastigotes per 100 cells were evaluated by counting a total of 500 cells in 3 different experiments. The LD<sub>50</sub> was estimated as the dose that reduced the number of amastigotes per infected cell by 50%.

During the experiments described above, some trypomastigotes were released into the supernatant. These trypomastigotes were designated as trypomastigotes differentiated in the presence of venom (TDVs). To isolate TDVs from cell debris, non-viable parasites and amastigotes, the supernatant was centrifuged at 500 g for 5 min and incubated at 37 °C for 30 min. During this period, viable TDVs in the pellet moved into the supernatant medium, which was subsequently collected and centrifuged at 3000 g

for 12 min. TDVs concentrated in the pellet were monitored based on motility and the detection of trypan blue exclusion by light microscopy as described above. Next, viable TDVs were washed twice in RPMI medium and used for a new invasion assay in the absence of Cvv venom to evaluate their infectivity. TDVs were incubated in the presence of new LLC-MK<sub>2</sub> cells (10:1 ratio) that had been previously cultivated as described above. Infected cells were cultivated for an additional 4–5 days in RPMI containing 2% FCS at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere without Cvv venom. As a control, LLC-MK<sub>2</sub> cells were infected with trypomastigotes that had been released into the supernatant of non-treated cell cultures, using the same procedures described for TDVs. Following washing in PBS, cover-slips from both control and TDV-cell interactions were collected daily, fixed and stained as described above. The numbers of intracellular amastigotes per infected cell and per 100 cells were evaluated by performing counts for a total of 500 cells in at least 3 independent experiments.

#### *Turbidimetric assay adapted from Marinetti*

Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activity was determined by adapting a turbidimetric assay described previously (Marinetti, 1965). We prepared the substrate by shaking 1 chicken egg yolk in a solution of NaCl (150 mM) to a final volume of 100 ml; the substrate was stored at 4 °C prior to the reaction. In each assay, we prepared several tubes by adding a volume (0.33 ml) of a 10% dilution of the egg suspension to a solution containing NaCl (150 mM), CaCl<sub>2</sub> (10 mM), taurocholic acid (0.01%) and Tris-HCl (5.0 mM, pH 7.4), until a spectrophotometric absorbance between 0.62 and 0.65 at 925 nm was achieved. The tubes were kept at 37 °C under mild and constant agitation during the procedure. The reactions were started by the addition of the Cvv venom at concentrations of 0.05–10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The specificity of the procedure was controlled by the measurement of *para*-bromophenacyl-bromide (*p*-BPB; Sigma), a specific PLA<sub>2</sub> inhibitor (Ownby *et al.* 1997; Melo and Ownby, 1999), added at concentrations of 100–500  $\mu\text{M}$ . Both tests were performed to evaluate the Cvv concentration range used to challenge trypomastigotes. The *p*-BPB stock solution (500 mM) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO).

#### *Trypomastigote challenge with pBPB-inhibited Cvv venom*

Trypomastigotes (CL-Brener clone) were treated for 1 day at 37 °C with 0.15, 0.3 and 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Cvv venom that had been previously incubated for 30 min at room temperature with 500  $\mu\text{M}$  *p*-BPB, according to the protocol described by Melo and Ownby (1999).

The parasites were concomitantly treated with the same concentrations of crude venom not previously exposed to *p*-BPB. Three types of control cells were used in the absence of Cvv venom: (i) parasites incubated in RPMI medium supplemented with 10% FCS; (ii) parasites incubated with DMSO (the final concentration of DMSO in the cultures did not exceed 0.1% vol/vol and had no effect on cell lysis); and (iii) parasites incubated with *p*-BPB only. The number of living parasites was determined by counting formalin-fixed parasites in a haemocytometer chamber in at least 3 independent experiments.

#### *Flow cytometry analysis*

Epimastigotes and tissue-culture trypomastigotes at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml were treated with Cvv venom at final concentrations of 0.5–4.0 and 0.15–1.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h at 28 °C and 37 °C, respectively. The viability assay was performed in a flow cytometer with propidium iodide (PI). Parasites were washed in PBS, and cells were incubated with 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI plus 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rhodamine 123 (Rh123) for 15 min. Cells were kept on ice until data acquisition and analysis with a FACSCalibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with CellQuest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA). A total of 10 000 events were acquired in the region previously established to correspond to the parasites. Differences in the Rh123 fluorescence level between treated and control parasites were quantified using an arbitrary index of variation (IV) obtained by the equation  $(\text{MT} - \text{MC})/\text{MC}$ , where MT and MC are the median fluorescence for treated and control parasites, respectively. Negative IV values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane. Data were obtained from at least 3 independent experiments.

#### *Scanning electron microscopy*

Epimastigotes and tissue culture trypomastigotes treated with 0.5 and 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the Cvv crude venom for 24 h, respectively, were washed twice with PBS and fixed for 1 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) containing 5 mM calcium chloride and 2% sucrose. The parasites were then washed with the same buffer and allowed to adhere to glass cover-slips previously coated with 0.1% poly-L-lysine (MW 70 000, Sigma). After post-fixation for 15 min with 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) containing 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), the cells were washed, dehydrated in graded ethanol and then critical-point dried with  $\text{CO}_2$ . The samples were allowed to adhere to scanning electron microscopy stubs coated with a 20-nm-thick gold layer in a

sputtering device and then were observed using a JEOL JSM 5310 scanning electron microscope (Tokyo, Japan) operating at 25 kV. Digital images were acquired and stored in a computer.

#### *Transmission electron microscopy*

Parasites were fixed for 1 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) containing 5 mM calcium chloride and 2% sucrose. Non-infected and infected LLC-MK<sub>2</sub> cells were fixed using the same fixative while still adherent, gently scraped off with a rubber policeman and were harvested by centrifugation. All samples were treated as follows: rinsed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) containing 2% sucrose; post-fixed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) containing 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ), 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride for 1 h at room temperature; dehydrated in graded acetone and then embedded in PolyBed 812 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Ultrathin sections obtained with a Leica (Nussloch, Germany) ultramicrotome were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed using a FEI Morgagni F 268 (Eindhoven, The Netherlands) transmission electron microscope operating at 80 kV.

## RESULTS

Epimastigotes were grown for 5 days in LIT medium containing different concentrations of Cvv venom, and the percentage of surviving parasites was evaluated (Table 1). The LD<sub>50</sub> (50% growth inhibition) after treatment for 24 h was 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and after treatment for 4 and 5 days, the LD<sub>50</sub> values were 0.9 and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. No growth was detected when the parasites were treated with 8–500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Cvv venom. Because trypomastigote forms did not multiply and could not be maintained for several days in culture medium at 37 °C, the effect of the venom on trypomastigotes was evaluated by its capacity to cause lysis after a 24-h treatment. The LD<sub>50</sub> of Cvv venom for trypomastigotes was 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Table 1). The effect of Cvv venom on amastigotes is also presented in Table 1. The LD<sub>50</sub> for intracellular parasites was determined on different post-infection days, taking into account the number of amastigotes per infected cell. The LD<sub>50</sub> for intracellular amastigotes after treatment for 24 h was 0.075  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , which is the smallest value obtained among the 3 developmental forms analysed.

The loss of viability of treated epimastigotes and trypomastigotes from the supernatant was assessed by light microscopy and flow cytometry using trypan blue (data not shown) and PI labelling, respectively. Epimastigotes and trypomastigotes incubated for 24 h in the presence of 0.5 and 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cvv venom and then in the presence of PI presented

Table 1. Effective LD<sub>50</sub> of crude Cvv venom against epimastigote, trypomastigote and intracellular amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

Day of treatment	Epimastigotes	Trypomastigotes	Intracellular amastigotes <sup>d</sup>
1	0.5 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.075 ± 0.01
2	0.6 ± 0.12	Nd <sup>c</sup>	0.037 ± 0.03
3	0.7 ± 0.12	Nd	0.29 ± 0.03
4	0.9 ± 0.43	Nd	0.17 ± 0.02
5	1.0 ± 0.49	Nd	Nd

<sup>a</sup> Values of LD<sub>50</sub> are expressed in µg/ml.

<sup>b</sup> Mean ± standard deviation. All assays were performed in triplicate and in at least 3 independent experiments.

<sup>c</sup> Not done.

<sup>d</sup> Determined by the daily evaluation of the number of intracellular amastigotes per infected cells.

Table 2. Flow cytometry analysis of Cvv-treated *Trypanosoma cruzi* labelled with PI and Rh123 (Cvv treatment was for 1 day in LIT at 28 °C for epimastigotes and in RPMI at 37 °C for trypomastigotes.)

	µg/ml	Median Rh123	IV <sup>a</sup>	PI (%) <sup>b</sup>
Epimastigotes	0	280.0 <sup>c</sup> ± 14.2	0.00	0.03 ± 0.01
	0.5	67.3 ± 2.1	-0.76	59.0 ± 0.2
	1.0	64.6 ± 0.9	-0.77	67.2 ± 1.4
	2.0	48.6 ± 1.2	-0.82	89.1 ± 3.3
	4.0	45.3 ± 1.4	-0.84	99.0 ± 0.5
Trypomastigotes	0	50.2 ± 3.8	0.00	1.2 ± 0.24
	0.15	35.1 ± 0.2	-0.30	19.0 ± 3.6
	0.3	32.9 ± 0.7	-0.34	43.2 ± 0.7
	0.9	24.5 ± 0.9	-0.51	68.7 ± 2.5
	1.8	17.6 ± 1.1	-0.65	86.9 ± 3.9

<sup>a</sup> Arbitrary Index of Variation – IV = (MT – MC)/MC, where MT and MC correspond to the median fluorescence average for treated and control parasites, respectively.

<sup>b</sup> Percentage of PI-positive cells.

<sup>c</sup> Data represent the mean ± standard deviation of at least 3 independent experiments.

approximately 60% and 43% non-viable cells, respectively. The values for PI labelling relative to the different venom concentrations used are shown in Table 2.

To determine whether the action of Cvv against *T. cruzi* parasites was due to the presence of enzymatic activities or to the presence of other types of molecules (e.g., alkaloids and other organic compounds, for example), we boiled the venom for different times and treated the epimastigote forms with 0.5 µg/ml of the treated venom (Fig. 1). Boiling the Cvv venom for 7.5 min did not abolish its activity completely, and a partial inhibitory effect of about 10–14% on epimastigote growth was observed up to 3 days post-treatment. Cvv venom activity was completely abolished after 15 and 30 min of boiling.

Morphological alterations in epimastigotes (Fig. 2) and trypomastigotes (Fig. 3) were observed by SEM after 1 day of treatment with 0.5 and 0.3 µg/ml of Cvv venom, respectively. Most of the treated parasites presented swelling of the body when compared to control cells (Figs 2B–D and 3B–D) and, occasionally, a complete alteration of the parasite shape was observed (Figs 2C and 3C, D). Some epimastigotes also presented an intense twisting of the cell body

(Fig. 2D). Trypomastigotes presented plasma membrane blebbing and membrane disruption with cytoplasmic eruption, indicating severe membrane disorganization (Fig. 3E).

Ultrastructural alterations caused by Cvv venom were also analysed using TEM (Figs 2 and 3). The most frequent cell alterations observed in epimastigotes were swelling of the cell body with apparent loss of normal organelle organization, vacuolization of the cytoplasm (Fig. 2E, H), swelling of the mitochondria with alterations in the mitochondrial membranes and the presence of myelin figures (Fig. 2E, F, H), and loss of cytoplasmic components (Fig. 2E, H). Eventually, several lysed epimastigotes were observed. The nuclear morphology also demonstrated alterations characterized by changes in the shape and organization of chromatin and the leakage of nuclear contents (Fig. 2G). Venom-treated trypomastigotes exhibited an enlarged space between the nucleus and the cytoplasm (Fig. 3F, inset). In trypomastigotes in which mitochondrial alterations were observed, we noted that the alterations were similar to those described for epimastigotes (Fig. 3J). The venom also caused an intense vacuolization of the cytoplasm, in which no clear structures and organelles could be

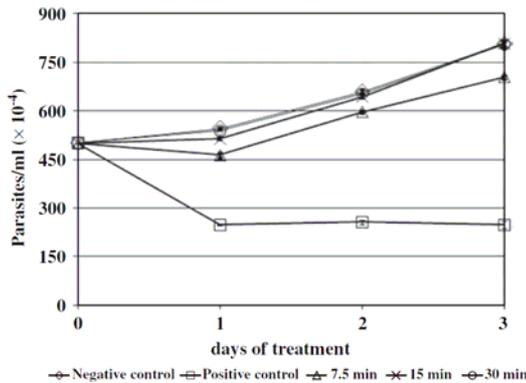


Fig. 1. Effect of boiled Cvv venom on the proliferation of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotes were incubated for up to 3 days at 28 °C with 0.5 µg/ml Cvv venom previously boiled for 7.5 (▲), 15 (✕) and 30 (○) min at 95 °C. Treatment with Cvv venom previously boiled for 7.5 min caused a discrete decrease in the growth rate of the parasite, whereas no effects were observed when epimastigotes were incubated with venom that had been boiled for 15 and 30 min. All treatments were compared to treatment with LIT medium alone (○) or treatment with 0.5 µg/ml Cvv crude venom (□). Values are the means from 3 independent experiments.

observed (Fig. 3H). In most trypomastigote forms, however, we observed a dense cytoplasm with swollen organelles and blebs budding from the cell body and flagellar membranes. In some blebs, rupture of the membrane structure could be observed (Fig. 3F, G, I, J). Despite the mitochondrial damage in both epimastigotes and trypomastigotes, the integrity of the kinetoplast DNA network was apparently preserved (Figs 2F, H and 3G, I).

The observed swelling of the mitochondria prompted us to treat *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes with Cvv venom for 1 day, followed by labelling with Rh123 and analysis by flow cytometry. The analysis confirmed the results obtained by TEM. When epimastigotes and trypomastigotes were treated with 0.5 and 0.3 µg/ml Cvv venom for 1 day, respectively, and then incubated with Rh123, a decrease in fluorescence was observed, suggesting a venom-mediated interference in the proton electrochemical potential gradient of the mitochondrial membrane. The reductions of the median fluorescence values of treated epimastigotes and trypomastigotes were dose-dependent, with IV values reaching  $-0.76$  and  $-0.34$  after Cvv treatment at the LD<sub>50</sub>, respectively (Table 2).

The marked morphological alterations in the plasma and organelle membranes led us to consider that these cellular components could be among the initial targets, or could possibly be the main targets, of the Cvv venom. To evaluate PLA<sub>2</sub> activity in the crude venom, we performed a turbidimetric assay adapted from Marinetti (1965). Significant PLA<sub>2</sub>

activity was observed in the crude Cvv venom at the different concentrations used in this study. The absorbance of the specific substrate was reduced by almost half after the addition of 0.1–10 µg/ml Cvv (Fig. 4A). The catalytic activity of PLA<sub>2</sub> present in 0.3 µg/ml of venom was inhibited by up to 60% in the presence of 500 µM *p*-BPB (Fig. 4B). *p*-BPB also inhibited the lytic activity of the venom in trypomastigotes. Trypomastigotes incubated for 24 h in the presence of 0.15, 0.3 and 0.6 µg/ml of Cvv venom presented 30, 52 and 80% lysis rates, respectively. When trypomastigotes were similarly incubated in venom that had been previously inhibited with 500 µM *p*-BPB, the lysis rates ranged between 12 and 57% (Fig. 4C). Thus, the PLA<sub>2</sub> activity present in the crude venom, as determined by *p*-BPB inhibition, might be involved not only in parasite lysis but also in the other effects observed by electron microscopy.

An important aspect of chemotherapy for intracellular parasites is that the drug may also gain access to the cytoplasm of host cells, interfering with the growth or differentiation of intracellular forms. It is also possible, however, that the drug could directly affect the host, interfering with the determination of such results. Therefore, we analysed the effects of different concentrations of Cvv venom on the ultrastructure and viability of non-infected LLC-MK<sub>2</sub> cells. Lysis, inhibition of growth and ultrastructural changes were only observed when cells were incubated with venom concentrations greater than 1 mg/ml for 24 h (data not shown). These concentrations are much higher than the LD<sub>50</sub> observed for all 3 developmental forms of the parasite (Table 1).

The observation of Giemsa-stained infected LLC-MK<sub>2</sub> cells before treatment by light microscopy revealed an increasing number of intracellular amastigotes on different days of the experiment (Table 3 and Fig. 5C). Infected LLC-MK<sub>2</sub> cells treated with different doses of Cvv venom demonstrated a significant decrease in the number of parasites per infected cell (Fig. 5A) and in the number of parasites per 100 cells (Fig. 5B), as compared to the parasite numbers determined in the control cells. Infected cells incubated for 72 h in the presence of 37.5 ng/ml Cvv venom presented reductions of approximately 76 and 94% in the number of parasites per infected cell and the number of parasites per 100 cells, respectively (Fig. 5C, D). The incubation of infected cells with 150 ng/ml Cvv venom not only significantly inhibited the growth of intracellular forms after 72 h of treatment but also caused a slight decrease in the number of parasites per infected cell (Fig. 5A). Ultrastructural analysis of intracellular amastigotes after 48 h of treatment revealed significant changes in cell structure when compared with the control. Cells presented swollen vacuoles and lysis of the cell membrane (Fig. 5E, F). A large number of parasites were observed in the supernatant of treated cell

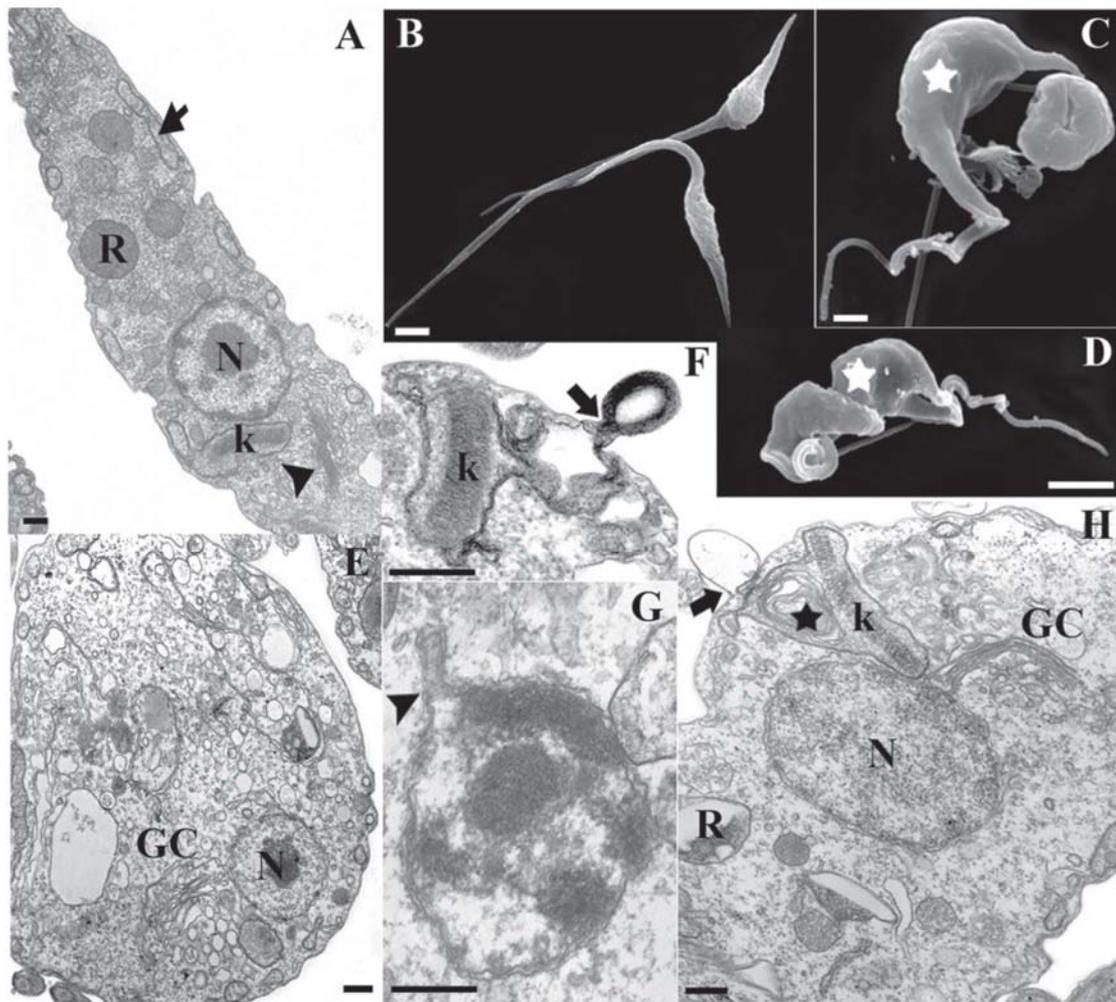


Fig. 2. Effect of Cvv venom on the ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes observed using transmission (A, E–H) and scanning (B–D) electron microscopy. Parasites were treated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  Cvv venom for 1 day. A–B: Untreated epimastigotes, showing typical elongated cell bodies and normal nuclear morphology (N), Golgi complex (arrowhead in A), kinetoplast (k), mitochondria (arrow in A) and reservosomes (R); C–D: treated parasites presenting swollen and twisted cell bodies (white star); E–H: treated parasites showing internal disorganization. The venom caused an intense swelling of the entire parasite, including all organelles, with loss of cytoplasm components (E). Blebs budding from the cell body membrane were observed (arrow in F and H). The nuclear membrane also presented morphological alterations (arrowhead in G). (H) Note the presence of myelin figures in the mitochondria (black star) and some altered reservosomes. Scale bars: A, E–G = 300 nm; B–D = 2  $\mu\text{m}$ .

cultures after 48 h of treatment (Fig. 5D). The detected developmental forms were amastigotes, intermediary forms and TDV trypomastigotes, which were observed only in cells treated with Cvv venom at concentrations lower than 250 ng/ml.

Trypan blue staining of TDVs revealed that 89% of the parasites were non-viable, and the ultrastructural analysis showed intense swelling of different organelles and remarkable internal disorganization (Fig. 6B), including alterations of the mitochondria (Fig. 6B, C) and leakage of nuclear content (Fig. 6C). Taking into account the possibility that even 10% viability could provide sufficient parasites to

perpetuate the infection, we decided to use those TDVs for a new infection challenge in the absence of Cvv venom (Fig. 6). The isolation of viable TDVs and control trypomastigotes is based on a mild centrifugation of the cell culture medium followed by incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$ , at which time viable and mobile trypomastigote forms leave the pellet and are present in the supernatant, from which they can be harvested by an additional centrifugation. We observed a progressive reduction of approximately 63–92% of the number of infected cells from 48 to 144 h post-infection when LLC-MK<sub>2</sub> cells were infected with TDVs (Table 3). The number of

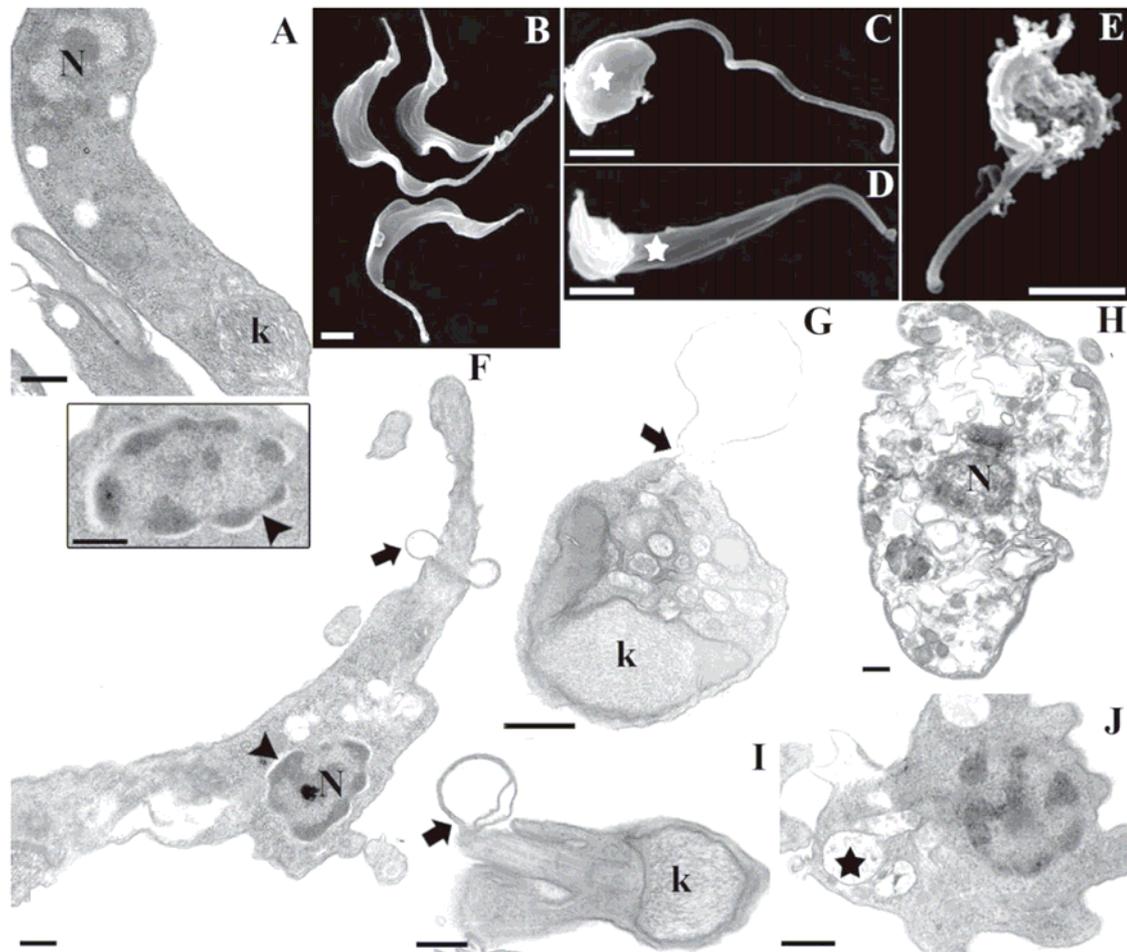


Fig. 3. Effect of Cvv venom on the ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes observed using transmission (A, F–J) and scanning (B–E) electron microscopy. Parasites were treated with  $0.3 \mu\text{g/ml}$  Cvv venom for 1 day. (A, B) Control parasites presenting a typical morphology with normal characteristics of the nucleus (N) and kinetoplasts (k). (C–E) Treated parasites presenting swollen and twisted cell bodies (white star in C and D), loss of membrane integrity and cell lysis (E and H). The main changes in the ultrastructure of the trypomastigotes observed by TEM were shrinkage of the nuclear membrane (arrowhead in the inset and in F), the presence of clear areas in the cytoplasm (star in F), blebs budding from the cell body (arrow in G) and from the flagellar membrane (arrows in F and I), and the presence of swollen organelles (G). (J) Note the swollen mitochondria (black star). Scale bars: A, F–J =  $300 \text{ nm}$ ; B–E =  $2 \mu\text{m}$ .

amastigotes per 100 cells was also significantly reduced during the same period. After 48 h of infection, 15 parasites derived from TDVs were observed per 100 host cells, representing a reduction of about 74% with respect to the number of parasites observed in cells infected with control trypomastigotes. After 144 h of infection, a reduction of approximately 96% was observed (Table 3).

#### DISCUSSION

The development of anti-parasite chemotherapy could emerge from the screening of natural products such as animal venoms and plant essential oils. Snake venoms are complex mixtures of a large

number of biologically active polypeptides, apparently inactive polypeptides of unknown significance, and small molecules such as adrenaline (Harris and Cullen, 1990; Passero *et al.* 2007).

Epimastigotes (the insect-borne stage) and trypomastigotes (the infective flagellate form) of *T. cruzi* were found to be sensitive to the venom. In comparison with previous studies using distinct crude venoms against epimastigote forms of *T. cruzi*, we observed that the  $\text{LD}_{50}/\text{day}$  of Cvv for epimastigotes ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) was between those obtained with the crude venom of *B. jararaca* and *C. cerastes* (Fernandez-Gomez *et al.* 1994; Gonçalves *et al.* 2002; Deolindo *et al.* 2005). The lysis of trypomastigote forms, as performed in this study, was not

Table 3. Evolution of intracellular development of TDV parasites in different post-infection periods

Time after infection (h)	Control% of infected cells	TDV% of infected cells	% Reduction	Control no. of amast./100 cells	TDV no. of amast./100 cells	% Reduction
48	27.5 ± 3.2*	9.7 ± 0.5	63.0 ± 2.0	58.4 ± 20.1	15.2 ± 2.5	74.0 ± 4.3
72	29.4 ± 4.8	9.7 ± 0.8	67.1 ± 2.9	71.8 ± 25.1	14.5 ± 2.3	79.7 ± 3.2
96	32.8 ± 9.4	4.4 ± 1.7	86.5 ± 5.3	84.2 ± 32.3	6.4 ± 2.0	92.4 ± 2.3
120	42.4 ± 15.8	3.7 ± 0.4	91.2 ± 1.1	106.8 ± 39.4	5.9 ± 0.2	94.4 ± 0.2
144	43.9 ± 17.0	3.5 ± 0.3	92.0 ± 0.7	114.7 ± 38.5	4.4 ± 0.6	96.1 ± 0.5

\* Mean ± standard deviation. All assays were performed in triplicate and in at least 3 independent experiments.

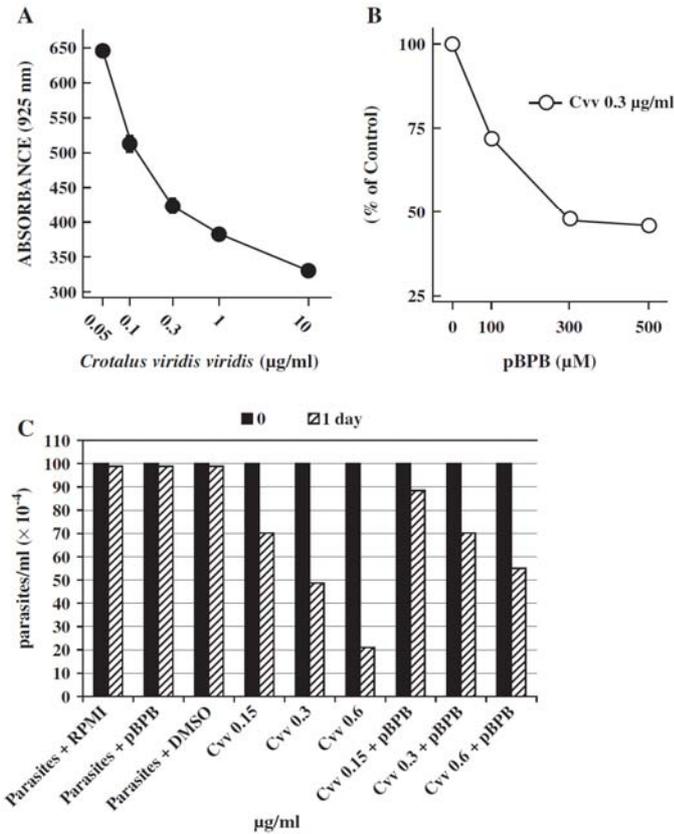


Fig. 4. PLA<sub>2</sub> activity of Cv crude venom and inhibition by pBPB. (A) Curve showing the phospholipase activity of Cv crude venom (0.05–10 µg/ml) in the presence of specific substrate. The enzyme activity was measured 30 min after addition of Cv crude venom (0.05–10 µg/ml) to the substrate solution. (B) Effect of pBPB (100–500 µM) on the phospholipase activity of Cv crude venom (0.3 µg/ml). Data are expressed as means ± s.e.m. ( $n=5$ ). (C) Inhibition of the PLA<sub>2</sub> activity of Cv crude venom treated with p-BPB. Lysis of trypomastigotes in the presence of Cv crude venom plus p-BPB was evaluated. Trypomastigotes were incubated for 1 day in RPMI medium in the presence of 0.15, 0.3 and 0.6 µg/ml of normal or p-BPB (500 µM)-treated Cv crude venom. The following controls were used: (i) parasites incubated in RPMI medium supplemented with 10% FCS (parasites + RPMI); (ii) parasites incubated in RPMI medium containing DMSO at the same dilution present in the p-BPB final solutions (parasites + DMSO); (iii) parasites incubated in RPMI medium containing 500 µM p-BPB (parasites + p-BPB).

evaluated in other studies of snake venoms. Although the LD<sub>50</sub> value for trypomastigotes (0.3 µg/ml) was lower than that obtained for epimastigotes, the statistical analysis revealed no differences between the LD<sub>50</sub> values for both developmental forms. Flow cytometry and ultrastructural analysis, however,

indicated that Cv crude venom possesses different mechanisms of action against epimastigotes and trypomastigotes, as will be discussed later.

Labelling with PI and Rh123 indicated different behaviours for epimastigotes and trypomastigotes in the presence of Cv crude venom. After incubation of both

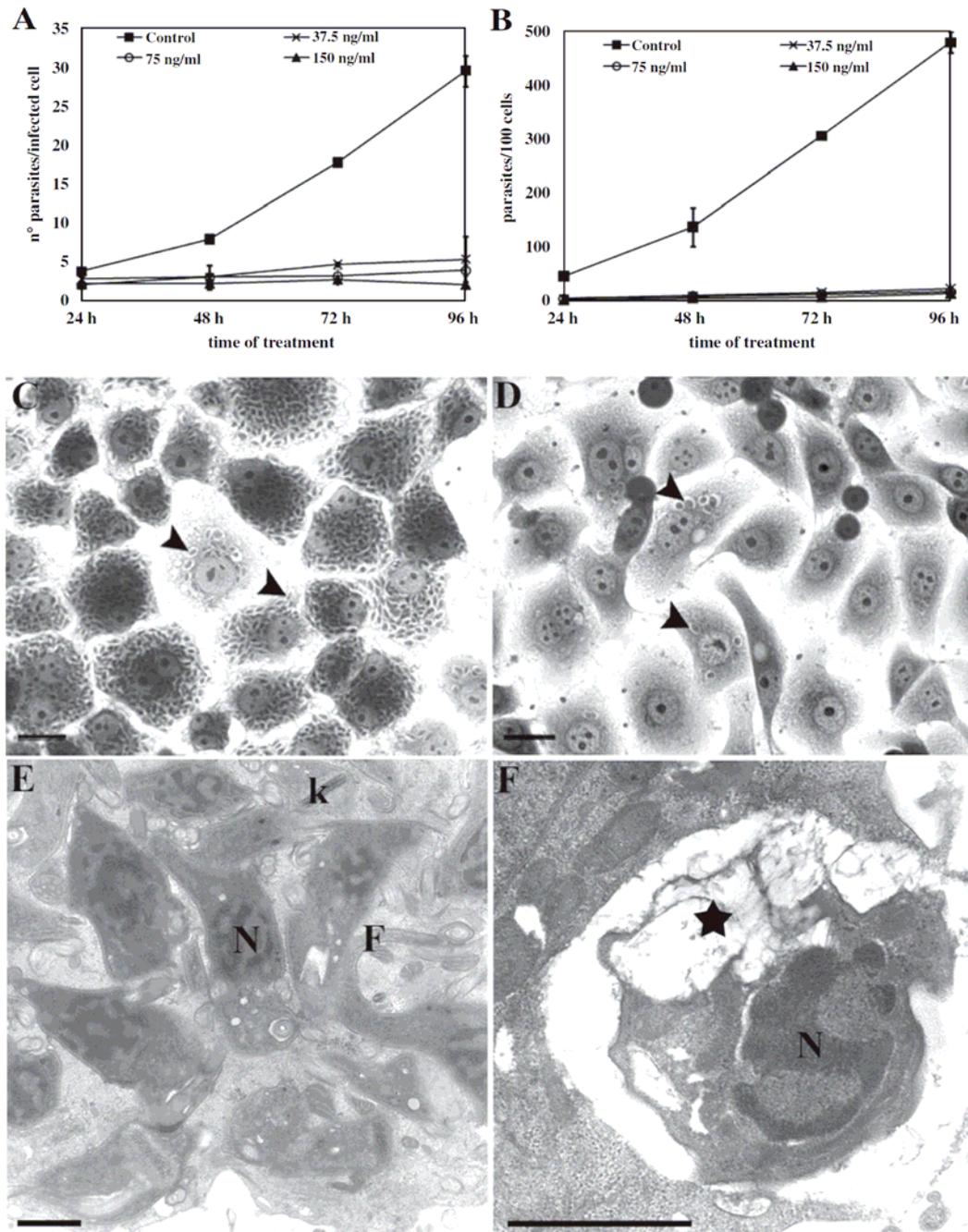


Fig. 5. Light (C–D) and transmission electron microscopy (E–F) of *Trypanosoma cruzi*-infected LLC-MK<sub>2</sub> cells following Cvv venom treatment. (A–B) Infection of LLC-MK<sub>2</sub> cells is almost abolished after treatment with 150 ng/ml Cvv venom for 4 days. The low infection level was maintained by incubation with 37.5 to 75 ng/ml Cvv venom during the same treatment period. (C, E) Control cells after 72 h of infection showing high infection rates with many intracellular amastigotes (arrowheads). By TEM, the intracellular parasites presented a typical morphology of the nucleus (N), kinetoplast (k), and flagellum (F). (D) Cells treated with 37.5 ng/ml for 48 h showed a very low level of infection with few intracellular amastigotes (arrowheads). The LLC-MK<sub>2</sub> cells demonstrated normal 4-day culture without alterations in size or shape. (F) Intracellular amastigotes after 48 h of treatment with 37.5 ng/ml Cvv venom presented an intense swelling of the cytoplasmic compartments (black star) with rupture of the cell membrane. Scale bars: C–D = 20  $\mu$ m; E–F = 1  $\mu$ m.

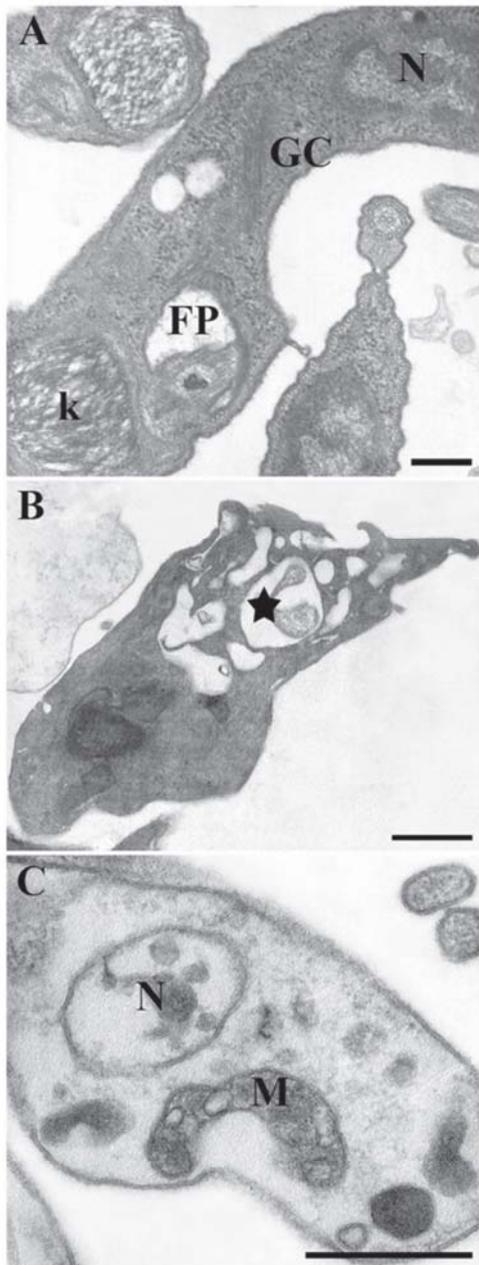


Fig. 6. Ultrastructural appearance and behaviour of TDVs. Transmission electron microscopy analysis of TDVs obtained from the supernatant of Cvv venom-treated LLC-MK<sub>2</sub> cells (B–C) showing profound internal disorganization with many swollen organelles (star in B); changes in the organization of the chromatin and leakage of the nuclear content like that of the cytoplasm (C); mitochondrial swelling and loss of matrix content, as compared to control trypomastigotes (A). Nucleus (N), mitochondria (M) Golgi complex (GC), kinetoplast (k) and flagellar pocket (FP). Scale bars = 0.3  $\mu$ m.

forms with their respective Cvv LD<sub>50</sub>, 60% and 40% of the epimastigotes and trypomastigotes, respectively, were PI-positive, indicating that lysis of the cell membrane is an important aspect of the effect of the venom. The analysis of Rh123 showed that at the LD<sub>50</sub>, reductions of approximately 76% and 34% of the numbers of labelled cells were observed for epimastigotes and trypomastigotes, respectively.

Ultrastructural analysis of treated epimastigotes and trypomastigotes revealed differences in the effects of Cvv venom that corroborate the flow cytometry results obtained for PI and Rh123 staining. Although similar morphological changes could be observed in both developmental forms, epimastigotes were significantly more swollen and presented greater mitochondrial damage with myelin figures than trypomastigotes. Most of the trypomastigotes had a dense cytoplasm and non-swollen mitochondria, as shown in Fig. 3G. The most characteristic lesion observed in trypomastigotes was the presence of large membrane projections budding from the cell body and the flagellum, confirming the action of the venom on the parasite membrane.

All of the observed morphological changes in addition to the flow cytometry data suggest that Cvv venom causes necrotic cell death in *T. cruzi*. Our results are similar to those of other groups who have characterized the activities of several drugs against *T. cruzi* epimastigote and trypomastigote forms (Menna-Barreto *et al.* 2009). However, more studies are necessary to characterize this phenotype.

The most important finding of the present study was the effect of Cvv venom on the intracellular cycle of the parasite. The proliferation of amastigotes, the intracellular stage of the protozoan responsible for the maintenance of infection in chagasic patients, was inhibited at concentrations of venom significantly lower than those necessary to kill trypomastigotes, or even to cause damage to the host cells. The Cvv venom was at least 10000-fold more toxic to the amastigotes than to LLC-MK<sub>2</sub> cells. In addition, at venom concentrations that still allowed the propagation of the entire intracellular cycle, we observed after 3–4 days of infection the presence of intermediary and trypomastigote forms in the cell culture medium that presented several structural changes similar to those described for the other venom-treated parasites. We termed these parasites TDVs and found that they were unable to initiate a new intracellular cycle even in the absence of venom. This finding was confirmed by not only the reduced number of infected cells in culture but also the number of amastigotes per 100 cells.

We did not elucidate the exact mechanism responsible for the trypanocidal action of Cvv venom, but in contrast to *B. jararaca* venom, the activity of Cvv venom was inhibited after boiling for 30 min (Gonçalves *et al.* 2002), suggesting the involvement of peptides and enzymes in the process.

Some PLA<sub>2</sub>s isolated from snake venoms have been reported to possess the ability to induce toxicity in muscle cells, with remarkable effects on the plasma membrane and mitochondria (Gutiérrez and Ownby, 2003). Ownby *et al.* (1997) have shown that Cvv venom contains a basic polypeptide similar to the PLA<sub>2</sub> myotoxins present in other snake venoms that have been shown to cause lysis of the plasma membrane. The general consensus on the mechanism of action of PLA<sub>2</sub>s is that the plasma membrane is the primary site of action. Our results demonstrating the partial inhibition of Cvv crude venom activity in the presence of *p*-BPB indicated that among the molecules present in the crude extract cells, PLA<sub>2</sub> might act directly on the parasite, and other compounds present in the Cvv total extract could function synergistically with PLA<sub>2</sub> on the parasites. This could explain the remaining action (about 30%) of the venom partially inhibited with *p*-BPB under conditions of 0.3 µg/ml Cvv venom and LD<sub>50</sub>/1 day treatment.

In addition to different enzymatic activities, some previous studies have shown that L-amino acid oxidases (L-AAOs) isolated from different snake venoms have the ability to kill *Leishmania* spp. and *T. cruzi* trypomastigotes (Tempone *et al.* 2001; Ciscotto *et al.* 2009). The enzymes that are largely responsible for the yellow colour of snake venoms convert free amino acids into  $\alpha$ -keto acids and produce hydrogen peroxide and ammonia (Tu, 1996). Cvv venom exhibits an intense yellow colour, suggesting the presence of L-AAO activity. A synergistic action between PLA<sub>2</sub> and L-AAO could be responsible to the observed effects on the parasites.

It is well known that the major limitation of the drugs currently available for Chagas' disease is the reduction of anti-amastigote activity during the chronic form of the disease, probably due to the limited tissue penetration (Urbina and Docampo, 2003). The present study demonstrates the potential effects of Cvv venom mainly against the intracellular forms of the parasite. The search for alternative treatments with different drugs or different drug combinations may improve the efficacy of treatment for Chagas disease.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr Antonio Bosco Carlos, Ms Edna Lúcia dos Santos Rocha and Ms Lusinete da Rocha Bonfim for valuable technical assistance.

#### FINANCIAL SUPPORT

The present work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-302440/2008-9) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ-E-26/102.299/2009 and Pensa Rio -E-26/110.401/2007).

#### REFERENCES

- Araya, C. and Lomonte, B.** (2007). Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. *Cell Biology International* **31**, 263–268. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.11.007.
- Bisaggio, D. F., Adade, C. M. and Souto-Pradrón, T.** (2008). In vitro effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**, 282–286. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.11.001.
- Bisaggio, D. F. R., Campanati, L., Pinto, R. C. V. and Souto-Pradrón, T.** (2006). Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: Changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Tropica* **98**, 162–175. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.04.003.
- Camargo, E. P.** (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **6**, 93–100.
- Ciscotto, P., Machado de Avila, R. A., Coelho, E. A. F., Oliveira, J., Diniz, C. G., Farias, L. M., Carvalho, M. A. R., Maria, W. S., Sanchez, E. F., Borges, A. and Chávez-Olortegui, C.** (2009). Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* **53**, 330–341. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.12.004.
- Corrêa, M. C. C. Jr., Maria, D. A., Moura-da-Silva, A. M., Pizzocaro, K. F. and Ruiz, I. R. G.** (2002). Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon* **40**, 739–748. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00275-6.
- Coura, J. R. and De Castro, S. L.** (2002). A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 3–24. doi: 10.1590/S0074-02762002000100001.
- Deolindo, P., Teixeira-Ferreira, A. S., Melo, E. J. T., Arnholdt, A. C. V., De Souza, W., Alves, E. W. and DaMatta, R. A.** (2005). Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**, 33–38. doi: 10.1590/S0074-02762005000100006.
- El-Rafael, M. F. and Sarkar, N. H.** (2009). Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Toxicon* **54**, 33–41. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.03.017.
- Fernandez-Gomez, R., Zerrouk, H., Sebti, F., Loyens, M., Benslimane, A. and Ouaisi, M. A.** (1994). Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interacts with the parasites. *Toxicon* **32**, 875–882. doi: 10.1016/0041-0101(94)90366-2.
- Fernandez, J. H., Neshich, G. and Camargo, A. C.** (2004). Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genetics and Molecular Research* **3**, 554–563.
- Gonçalves, A. R., Soares, M. J., De Souza, W., DaMatta, R. A. and Alves, E. W.** (2002). Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced

- by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitology Research* **88**, 598–602. doi: 10.1007/s00436-002-0626-3.
- Gutiérrez, J. M. and Ownby, C. L.** (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* **42**, 915–931. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.005.
- Harris, J. B. and Cullen, M. J.** (1990). Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microscopy Reviews* **3**, 183–211.
- Koh, D. C. I., Armugam, A. and Jeyaseelan, K.** (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 3030–3041. doi: 10.1007/s00018-006-6315-0.
- Marinetti, G. V.** (1965). The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **98**, 554–565. doi: 10.1016/0005-2760(65)90152-9.
- Melo, P. A. and Ownby, C. L.** (1999). Ability of wedelolactone, heparin, and *para*-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins. *Toxicon* **37**, 199–215. doi: 10.1016/S0041-0101(98)00183-4.
- Menna-Barreto, R. F. S., Salomão, K., Dantas, A. P., Santa-Rita, R. M., Soares, M. J., Barbosa, H. S. and De Castro, S. L.** (2009). Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron* **40**, 157–168. doi: 10.1016/j.micron.2008.08.003.
- Moncayo, A. and Silveira, A. C.** (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 17–30. doi: 10.1590/S0074-02762009000900005.
- Newman, R. A., Vidal, J. C., Viskatis, L. J., Johnson, J. and Echeverry, M. A.** (1993). VRC TC-310-1 novel compound of purified animal toxins separated anti-tumor efficacy from neurotoxicity. *Investigational New Drugs* **11**, 151–159.
- Ownby, C. L., Colberg, T. R. and White, S. P.** (1997). Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* **35**, 111–124. doi: 10.1016/S0041-0101(96)00054-2.
- Pai, L. H., Wittes, R., Setser, A., Willingham, M. C. and Pastan, I.** (1996). Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: on antibody linked to pseudomonas exotoxin. *Nature Medicine* **2**, 350–353.
- Papo, N. and Shai, Y.** (2003). New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry* **42**, 9346–9354. doi: 10.1021/bi027212o.
- Papo, N., Shahar, M., Eisenbach, L. and Shai, Y.** (2003). A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 21018–21023. doi: 10.1074/jbc.M211204200.
- Papo, N., Braunstein, A., Eshhar, Z. and Shai, Y.** (2004). Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L- amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Research* **64**, 5779–5786.
- Passero, L. F. D., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Laurenti, M. D. and Toyama, M. H.** (2007). Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitology Research* **101**, 1365–1371. doi: 10.1007/s00436-007-0653-1.
- Tempone, A. G., Andrade, H. F., Spencer, P. J., Lourenço, C. O., Rogero, J. R. and Nascimento, N.** (2001). *Bothrops moajeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 620–624. doi: 10.1006/bbrc.2000.4175.
- Tempone, A. G., Sartorelli, P., Mady, C. and Fernandes, F.** (2007). Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* **5**, 222–235.
- Toyama, M. H., Toyama, D. de O., Passero, L. F., Laurenti, M. D., Corbett, C. E., Tomokane, T. Y., Fonseca, F. V., Antunes, E., Joazeiro, P. P., Beriam, L. O., Martins, M. A., Monteiro, H. S. and Fonteles, M. C.** (2006). Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* **47**, 47–57. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.09.008.
- Tsai, I.-H., Wang, Y.-M., Chen, Y.-H. and Tu, A. T.** (2003). Geographic variations, cloning, and functional analyzes of the venom acidic phospholipases A<sub>2</sub> of *Crotalus viridis viridis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **411**, 289–296. doi: 10.1016/S0003-9861(02)00747-6.
- Tu, A. T.** (1996). Overview of snake venom chemistry. In *Natural Toxins II* (ed. Singh, B. R. and Tu, A. T.), pp. 37–63. Plenum Press, New York, USA.
- Urbina, J. A. and Docampo, R.** (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology* **19**, 495–501. doi: 10.1016/j.pt.2003.09.001.
- Zhang, Y. J., Wang, J. H., Lee, W. H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y. T. and Zhang, Y.** (2003). Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**, 598–604. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.08.044.
- Zhou, Q., Sherwin, R. P., Parrish, C., Richters, V., Groshen, S. G., Tsao-Wei, D. and Markland, F. S.** (2000). Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Aghkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Research* **61**, 249–260. doi: 10.1023/A:1006457903545.
- Zieler, H., Keister, D. B., Dvorak, J. A. and Ribeiro, M. C.** (2001). A snake venom phospholipase A<sub>2</sub> blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *The Journal of Experimental Biology* **204**, 4157–4167.

## Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs

Camila Marques Adade and Thaïs Souto-Pradón\*

Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo e Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Abstract:** Protozoan parasites cause disease in humans worldwide, and many fall into the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*; these parasites are responsible for African trypanosomiasis, Chagas disease and the different forms of Leishmaniasis. Strategies for the development of new drugs against these protozoans have been based on their cell biology and biochemistry complemented by the use of electron microscopy. *Trypanosoma* and *Leishmania* have special organelles that are involved in metabolic pathways, which are very distinct from those in mammalian cells; these organelles are potential drug targets. Scanning and transmission electron microscopy can identify not only the target organelles but also alterations to the cell surface and ultrastructural changes that characterize distinct forms of programmed cell death.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, African trypanosomes, chemotherapy, ultrastructure.

### 1. INTRODUCTION

Parasitic protozoans of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* infect millions of people around the world. The diseases (African sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis) caused by these parasites are in the group of 13 neglected tropical diseases classified by the World Health Organization. All of them occur in areas of extreme poverty and are forgotten by the government, while chemotherapy in patients is not economically attractive to pharmaceutical companies. Other factors that make this situation even worse are the lack of effective vaccines, the use of old, toxic drugs with variable efficacy and parasite resistance, the parenteral administration and the length of treatment [1-3].

Despite the lack of interest of different governments in eradicating these diseases, the trypanosomatids (even those not pathogenic to mammals) are the primary focus of various research groups around the world as important models for studying certain aspects of basic eukaryotic cell biology. Ultrastructural, physiological, biochemical and molecular approaches have shown that trypanosomatids (like other protozoan parasites) present special organelles, different metabolic pathways and special classes of enzymes. These features can be targeted for the development of new specific chemotherapeutic agents, including those isolated from natural compounds that can minimize the toxic effects on the host [3, 4-7].

In this review we will discuss how electron microscopy can help to identify the cellular locations of molecular targets of several drugs in different developmental stages of *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania* spp. We will

also describe in detail the effects of drugs on the ultrastructure of the parasites.

### 2. ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF DRUG-TREATED PARASITES

Scanning and transmission electron microscopy have been frequently used in the study of drug-treated parasites. With the scanning electron microscope (SEM), changes in cell shape (shrinking, swelling, twisting), loss of the flagellum and cell membrane rupture can be observed. With the transmission electron microscope (TEM), the fine structure of the cell membranes and the different organelles can be observed. Changes in composition of the organelles can be analyzed by cytochemical techniques, X-ray microanalysis or electron spectroscopy with loss of energy [8]. A brief explanation of the normal morphology of the parasites and the mechanism of action of the different classes of drugs will be presented.

#### 2.1. Mitochondria

Trypanosomatids have only one highly ramified mitochondrion distributed throughout the protozoan body as revealed by observations of thick serial sections and of whole cells with high-voltage electron microscopy [8]. The mitochondrion is present in all developmental forms of the different trypanosomatids, and significant changes in the morphology of the organelle were observed in African Trypanosomes and in *Herpetomonas samuelpessoai* depending on the metabolic activity of the parasites. The morphological differences observed included changes in the relative volume of the mitochondrion in relation to the whole cell, the presence of cristae and the expression of mitochondrial enzymes. Although no differences in mitochondrial structure were observed among the three developmental stages of *T. cruzi* and *Leishmania*, differences in molecular composition cannot be ruled out and could be important to define new molecular targets.

\*Address correspondence to this author at the Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto de Microbiologia Paulo e Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco I, Av. Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Tel: 55-21-2562-6738; Fax: 55-21-2560-8344; E-mail: soutu.padron@micro.ufjf.br

The most frequent effect of different chemotherapeutic agents on trypanosomatid mitochondria is swelling of the organelle, the intensity of which varies according to the type and concentration of the drug and the time of incubation [9, 10].

Cationic drugs, such as crystal violet, which are used to prevent transfusion-associated Chagas disease and aromatic diamidines were the first drugs to be used in chemotherapy against pathogenic trypanosomatids [11-15]. The effect of crystal violet on *T. cruzi* is due to enhancement of production of reactive oxygen species (ROS) that inhibit mitochondrial respiration and cause its swelling, which is more intense in trypomastigotes [14].

Aromatic diamidines (such as pentamidine) have been used with success for more than 60 years in the therapy and prophylaxis of African trypanosomiasis and antimony-resistant visceral leishmaniasis [16, 17]. They have been described as DNA binders but also inhibit multiple classes of enzymes such as proteases, topoisomerases, polymerases, and others [15]. More recently, new diamidine-related analogues were developed that present improved anti-parasitic activity against *T. cruzi* and *Leishmania* [18, 19]. In *T. cruzi*, some of the new compounds (classified as reversed amidines) presented a high level of activity against amastigotes and trypomastigotes both *in vivo* and *in vitro* [18-26]. Ultrastructural analysis showed that the different aromatic diamidines displayed similar effects in *T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania*, characterized by the presence of swollen mitochondria presenting low electron-density structures, fragmentation of the membrane and crista and mitochondrial disruption [12, 13, 18, 20, 23, 24, 27-32].

*T. cruzi* and *Leishmania* mitochondria are altered when the parasites are incubated in the presence of sterol biosynthesis inhibitors (SBIs). Sterols are constituents of cellular membranes that are essential for their normal structure and function. The success of SBIs in the treatment of Chagas disease and leishmaniasis is mainly due to a particular aspect of sterol biosynthesis in these parasites: unlike mammalian cells and similar to fungi, some members of the Trypanosomatidae family synthesize a special class of sterols (i.e., ergosterol and other 24-methyl sterols) instead of cholesterol. Ergosterol biosynthesis depends on the presence of a specific enzyme,  $\Delta^{24(25)}$ sterol methyltransferase (SMT), which is not found in mammalian cells, and the use of its specific inhibitors has potential as an effective chemotherapy [9]. Several drugs that interfere with sterol biosynthesis were used in studies with *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania*. These include statins, which act on the mevalonate pathway by inhibiting HMG-CoA reductase [33]; biphosphonates, which interfere with the isoprenoid pathway in the step catalyzed by farnesyl diphosphate synthase (FDS) [34]; zaragozic acid and quinuclidines, which are inhibitors of squalene synthase (SQS) [35]; allylamides such as terbinafine, which are inhibitors of squalene epoxidase [33]; azoles such as ketoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole, which inhibit C14 $\alpha$ -demethylase; and azasterols, which inhibit SMT.

Morphological changes observed in the mitochondria of trypanosomatids can be explained by the presence of ergosterol in their membranes [36]. Ketoconazole produces an in-

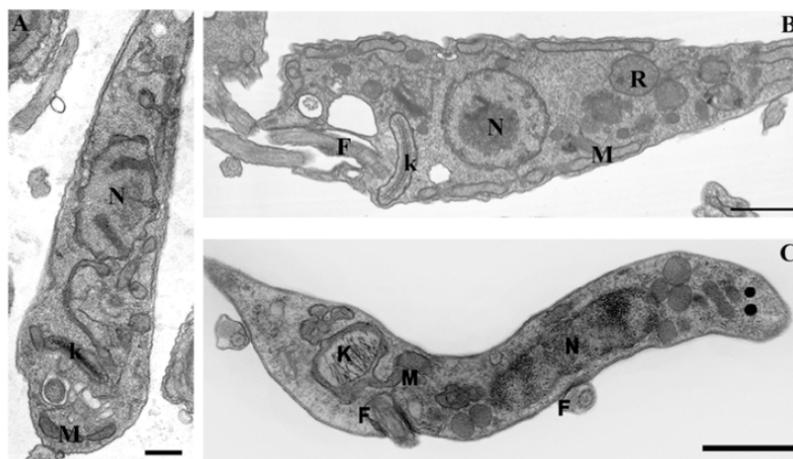
tense swelling of the mitochondrion, which may occupy up to 80% of the cell volume in *T. cruzi* with loss of inner membrane organization and matrix contents [37]. The combination of ketoconazole and terbinafine, in addition to inducing swelling, also caused the formation of paracrystalline arrays within the matrix of the *Leishmania* mitochondrion [37, 38]. SQS inhibitors produce mitochondrial swelling, separation of the outer and inner membranes and the presence of myelin-like figures and concentric membranes in the mitochondrial matrix [39-42]. The same effects were observed after treatment of *T. cruzi* and *Leishmania* with SMT inhibitors [43-46]. No alterations in mitochondrion structure have been described in *T. cruzi* after incubation in the presence of miconazole or econazole [47].

Lysophospholipid analogues (LPA) are a class of compounds that have been developed as anticancer agents. Their mechanism of action is based on their ability to insert into the membrane lipid bilayer and to change properties such as permeability, fluidity and signal transduction. LPA also interfere with the synthesis, breakdown and modification of membrane lipids [48]. More recently, these compounds were also tested against *Leishmania* and *T. cruzi* [49]. Miltefosine, edelfosine and ilmofosine caused swelling of *Leishmania* mitochondria and the presence of concentric membranes in the mitochondrial matrix [50]. No alterations were observed when *T. cruzi* was treated only with edelfosine; however, combined treatment with LPA analogues plus ketoconazole induced mitochondrial swelling [51, 52].

Lapachol and  $\beta$ -lapachone are naphthoquinones isolated from *Tabebuia* spp. trees that show activity against viruses, tumoral lineages and pathogenic microorganisms [53]. The mechanism of action of these compounds involves the generation of free radicals, which promote mitochondrial dysfunction. The effect of naphthoquinones and their naphthothiazole derivatives on mitochondrion structure are drastic, with an intense swelling and the presence of intramitochondrial vesicles [54-58].

The polyamine biosynthetic pathway has been shown to be an effective target for treatment against diseases caused by protozoan parasites. In trypanosomatids, the inhibition of polyamine synthesis impairs the synthesis of trypanotone, which is essential for protection of the parasite against reactive oxygen species produced by the host [59]. Interference in the synthesis of polyamines with eflornithine or DFMO (difluoromethylornithine), a selective irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase (ODC), induces changes in the differentiation process in *T. b. gambiense*. However, it was not effective against *Leishmania* or *T. cruzi* due to differences in the gene and an inability to produce significant amounts of putrescine, respectively [60-63]. Use of the putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone (DAB) caused inhibition of the proliferation of *Leishmania* and *T. cruzi* and severe damage to the mitochondrion characterized by swelling, fenestration and the presence of few cristae [64-68].

Alternative treatments have been introduced into the chemotherapy of parasitic diseases, and many studies based on the use of synthetic compounds, plant extracts, natural products and venoms have been published. The biological activity of natural products is mainly associated with the presence of compounds such as flavonoids, aromatic acids,



**Fig. (1).** Ultrathin sections showing untreated parasites presenting typical morphologies. (A) An *L. amazonensis* promastigote. (B-C) A *T. cruzi* epimastigote and a trypomastigote, respectively. N, nucleus; K, kinetoplast; M, mitochondrion; F, flagellum; R, reservosome. Bars: 1  $\mu$ m. (A) Courtesy of J. C. Rodrigues. (B) Image from T. Souto-Padrón. (C) Image reproduced with permission from Ref. [58] © (2009) Elsevier.

peptides and others. Although many studies have been published on *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania*, few have characterized the effects of these products on the ultrastructure of the parasites. Mitochondrial swelling and the presence of concentric membrane structures in its matrix were observed after incubation of *Leishmania* and *T. cruzi* with any of the following: linalool-rich essential oil of *Croton cajucara* [69], usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* [70], extract of the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* [71], extract of the seeds of *Pterodon pubescens* with geranylgeraniol (GG-OH) being the most active fraction [72], propolis [73], taxol isolated from *Taxus brevifolia* [74], dinitroaniline herbicides [75],  $\beta$ -carboline [76], chalcones from *Piper aduncum* [77], or neolignan from leaves of *Piper regnellii* [78].

## 2.2. Kinetoplast

The kinetoplast is a fibrous network of the mitochondrial DNA (kDNA) of the protozoa Trypanosomatidae and Bodonidae. The kDNA, which represents about 30% of the total cellular DNA, may be dispersed or concentrated in a specialized region of the mitochondrion near the basal body, from which the flagellum emerges [79]. The kinetoplast shape and its localization relative to the nucleus vary according to the developmental stage of the different trypanosomatids. Two main forms are observed in *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania*: a compact rod- or bar-shaped structure observed in epimastigotes, promastigotes and amastigotes and a round form with a more dispersed array of the kDNA filaments, which is found in trypomastigote forms. The kDNA is composed of two circular types of DNA, maxicircles (small in number), which encode rRNAs and mitochondrial proteins, and thousands of minicircles, which encode guide RNAs that modify the maxicircle transcripts in a process known as RNA editing. According to Motta, maxicircles and minicircles are connected in a special catenated network array that resembles the chain mail of medieval armor [80]. Kinetoplast DNA minicircles have extensive closely-spaced phased

AT sequences that yield curved double-helical structures and provide potential cellular targets for diamidines that have AT sequence binding specificity [81].

The main alteration observed in the kinetoplast as an effect of the different drugs cited above is the disorganization of the kDNA network. There are different grades of disorganization such as: a) looser organization of the DNA filaments in the kDNA network; b) fragmentation of the kDNA, forming many clusters of electron-dense structures inside the mitochondrion; and c) compaction and multiple kDNAs.

Looser kDNA organization is observed when parasites are incubated with naphthoquinones and naphthoimidazoles [55-58]. Sometimes, the disorganization of the kDNA network, which has mainly been observed in trypomastigotes, seems to be the result of the severe swelling of the mitochondrion and the loss of the inner membrane. In contrast, aromatic diamidines [18, 20-23], natural and synthetic  $\beta$ -carboline [76], topoisomerase inhibitors [80, 82, 83], and DAB [68] cause a drastic effect: the destruction or fragmentation of the kDNA network in promastigotes and amastigotes of *Leishmania* and in trypomastigotes of *T. cruzi*. These effects were not observed in the kinetoplasts of epimastigote forms of *T. cruzi*. It is important to note that the looser kDNA aspect observed in pathogenic trypanosomatids after chemotherapy is not similar to the constitutive looser arrangement observed in endosymbiont-bearing trypanosomatids, such as *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia deanei* and *Bodo* spp. [80].

Compaction of the kDNA filaments and the presence of multiple kinetoplasts were obtained after treatment of *T. cruzi* epimastigotes with piperine, which is an alkaloid of the *Piper* species. In some parasites, more than one individualized kinetoplast can be observed, mimicking the effects of cytoskeleton inhibitors. In other parasites, however, up to three kDNA bars can be seen inside the same mitochondrion [84].

No structural changes in the kDNA network of *T. cruzi* or *Leishmania* were described in the presence of LPA analogues or SBIs. [37, 39-42, 44-46, 50, 52].

### 2.3. Nucleus

The trypanosomatid nucleus presents a typical nuclear membrane with pores, condensed chromatin of varied density dispersed throughout the nuclear matrix up to the nuclear periphery. The nuclear envelope remains intact during the entire division process, with the appearance of intranuclear microtubules, chromatin dispersion and initiated formation of dense plates, the number of which varies according to the trypanosomatid species [8].

Some ultrastructural effects observed in the nucleus in the presence of different drugs indicate which death pathway the protozoan is undergoing. Different compounds may induce different types of programmed cell death (PCD), including apoptosis (type I PCD), autophagic cell death (type II PCD) and programmed necrosis (type III PCD) [10, 57, 58].

Aromatic diamidines and related analogues are DNA minor groove-binding ligands at AT sequences, and they exhibit strong antiparasitic activity [17]. Furamide (DB75), its *N*-phenyl-substituted analogue (DB569) [18], and reversed [22, 23] and aromatic diamidines [26, 85] induce severe alterations in nuclear morphology. After DB75 and DB569 treatment, *T. cruzi* trypomastigotes presented characteristics of type I PCD [20, 21].

Treatment of *L. chagasi* promastigotes with ER-119884, an SQS inhibitor, resulted in altered nuclear chromatin organization with some alterations in the nuclear envelope [42].

One of the most remarkable ultrastructural effects observed in *T. cruzi* treated with naphthofuranquinones is strong nuclear envelope swelling [57, 58]. Similar effects were seen in *L. chagasi* promastigotes treated with telocinobufagin, a steroid isolated from *Rhinella jimi* parotid macrogland secretions [86], and in *T. cruzi* forms treated with *Ocimum basilicum* essential oil [87] or L-leucine methyl ester (Leu-OMe) [88], where the condensed nuclear material became separated from the nuclear membrane with leakage of its content.

Treatment with different DNA topoisomerase inhibitors causes morphological alterations to the parasites' nuclei. Characteristics like nuclear envelope distension and chromatin condensation were observed in *T. cruzi* epimastigotes after incubation with bacterial DNA topoisomerase type II [89]. Recently, the use of aspartyl peptidase inhibitors (PIs) has been demonstrated to exert a direct effect on *Leishmania* [90, 91]. *L. amazonensis* promastigotes treated with lopinavir, an HIV PI, presented condensed chromatin close to the nuclear envelope, a feature suggestive of apoptotic death [91].

*T. cruzi* trypomastigotes treated with suramin exhibited an altered nuclear division pattern and frequently presented irregular or multiple nuclei [92]. Vinblastin-resistant *L. amazonensis* also presented dysfunctional cytokinesis, in which the resistant promastigotes showed multiple nuclei [93]. This characteristic was found in parasites treated with the squalene synthase inhibitors BPQ-OH, ER-119884 and E5700;

promastigotes were frequently multinucleate with unusual chromatin condensation [40, 41]. *L. amazonensis* amastigotes treated with edelfosine also presented abnormal numbers of nuclei [50].

### 2.4. The Cell Surface

The cell surface of trypanosomatids, as observed by TEM, is composed of three different components: the cell coat (or glycocalyx), the cell membrane and the sub-pellicular microtubule layer. The cell coat is in direct contact with the extracellular medium and is composed of oligosaccharides associated with membrane lipids and proteins. The use of freeze-fracture and freeze-etching with TEM has shown that the cell membrane of trypanosomatids presents domains characterized not only by a distinct chemical composition, but also by association with the sub-pellicular microtubules. The first and largest domain is composed of the membrane lining the cell body. The second and the third are the flagellar membrane and the flagellar pocket membrane, respectively [94].

Different drugs have different effects on the cell body and the flagellar membranes. Aromatic diamidines [26] and reversed diamidines [22, 23] cause detachment of the plasma membrane in areas where sub-pellicular microtubules are not observed. The presence of blebs budding from the cell body membrane and from the flagellar membranes are observed in epimastigotes of *T. cruzi* and promastigotes of *Leishmania amazonensis* after treatment with SMT [39, 46] and SQS inhibitors [41], respectively. Rupture of the flagellar membrane was also observed in promastigotes of *Leishmania chagasi* incubated in the presence of BPQ-OH, an SQS inhibitor [42].

Synthetic naphthoquinones caused the formation of blebs in the plasma and flagellar membranes of *T. cruzi* epimastigotes [58]. Naphthoimidazoles derived from  $\beta$ -lapachone showed a preferential effect on trypomastigotes in which bleb formation was observed throughout the cell body and flagellar membranes. Blebs associated with the cell body membrane did not present any sub-pellicular microtubules [57].

Lysophospholipid analogues caused the formation of blebs in *L. amazonensis* and *T. cruzi*, and the effects were more evident when edelfosine, miltefosine and ilmofosine were combined with ketoconazole [50-52].

Plasma membrane disruption was described after treatment of *T. cruzi* and *T. brucei* with antimicrobial peptides such as defensins and cathelicidins, respectively [95, 96], and in *Leishmania* after incubation with cecropin A-melittin peptides and with the essential oil of *Croton cajucara* [69, 97].

The last kind of cell surface change observed after treatment of trypanosomatids with different drugs is alterations in the amount and/or localization of surface molecules. Do-campo *et al.* showed that treatment of *T. cruzi* with miconazole and econazole caused enhanced response of the parasite to the lectins WGA (wheat germ agglutinin) and PHA (phytohemagglutinin) [47]. Treatment of *T. cruzi* with suramin, a symmetrical polysulfonated derivative of urea used in the prophylactic treatment of human trypanosomiasis in Africa, caused increased activity of a  $Mg^{2+}$ -ecto-ATPase and the FRA antigen and redistribution of negative surface charges.

Alterations in extracellular components in the region of adhesion between the cell body and the flagellum and an increase in the adhesion of epimastigotes to resident macrophages were also observed [92, 98, 99].

### 2.5. Cytoskeleton

Trypanosomatids present a continuous layer of microtubules immediately below the cell membrane, named the sub-pellicular microtubule layer. They are distributed throughout the protozoan body, with the exception of the flagellar pocket. The number of microtubules varies in different regions of the body of the parasite, but they are regularly spaced and connected by filaments to each other, to the inner face of the plasma membrane and to cytoplasmic organelles, such as the endoplasmic reticulum. One of the characteristics of the sub-pellicular microtubules is their high proportion of acetylated and/or polyglutamylated tubulins, which make them very stable [100]. Although actin and actin-binding proteins have been characterized in trypanosomatids, in *T. cruzi* they do not seem to be associated with sub-pellicular microtubules, as observed in *Leishmania* [101].

No damage to sub-pellicular microtubules was observed after treatment of *T. cruzi* and *Leishmania* with taxol, colchicine, vinblastine, trifluralin and ansamitocin P3, piperine or suramin. However, changes in the shape of the parasites, the presence of multiple flagellae, aberrant cell types with multiple kinetoplasts and absence of a nucleus were observed; these changes are probably due to incomplete differentiation and cytokinesis [74, 75, 84, 92, 102, 103]. Disorganization of the sub-pellicular microtubule layer was only observed in amastigotes of *T. cruzi* incubated in the presence of reversed amidines [22, 23].

### 2.6. Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex

The endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi complex (GC) in trypanosomatids have the same basic structure as that observed in all eukaryotic cells. The localization of the GC may vary according to the developmental form analyzed, but in all cases the CG remains near the flagellar pocket. Different classes of drugs affect the physiology of the ER-Golgi system, resulting in ultrastructural changes.

Sterol biosynthesis inhibitors have pronounced effects on the ER and GC [41]. Treatment with terbinafine and different azole derivatives caused modifications in ER-GC structures, which were characterized by the presence of large multivesicular bodies and autophagic structures [37, 38]. The inhibition of squalene synthase (SQS) by different inhibitors, such as BPQ-OH, ER-119884 and E5700, caused disorganization and fragmentation of Golgi complex cisternae, the appearance of myelin-like figures in the cytoplasm and an increase in the number of autophagosomal structures and multivesicular bodies characteristic of autophagy. [39-42]

Another class of enzyme inhibitor that has been extensively tested against *T. cruzi* is the cysteine protease inhibitors (CPI) [104-106]. They showed remarkable effects on GC structure in *T. cruzi* epimastigotes and intracellular amastigotes, which presented an increase in size and in the number of cisternae (from 5-7 to up to 16) in addition to the presence of dilated vesicles.

Epimastigotes and trypomastigotes treated with protein kinase (PK) and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors, such as genistein, staurosporine and wortmannin, also presented autophagosomal structures that were characterized by ER profiles surrounding several organelles [107].

Swelling of the ER-Golgi system is a common effect in *T. cruzi* trypomastigotes treated with reversed amidines [22, 23] and DAB [66]. Vinblastine treatment also caused *Leishmania* ER cisternae to protrude outward and to contact the plasma membrane [93].

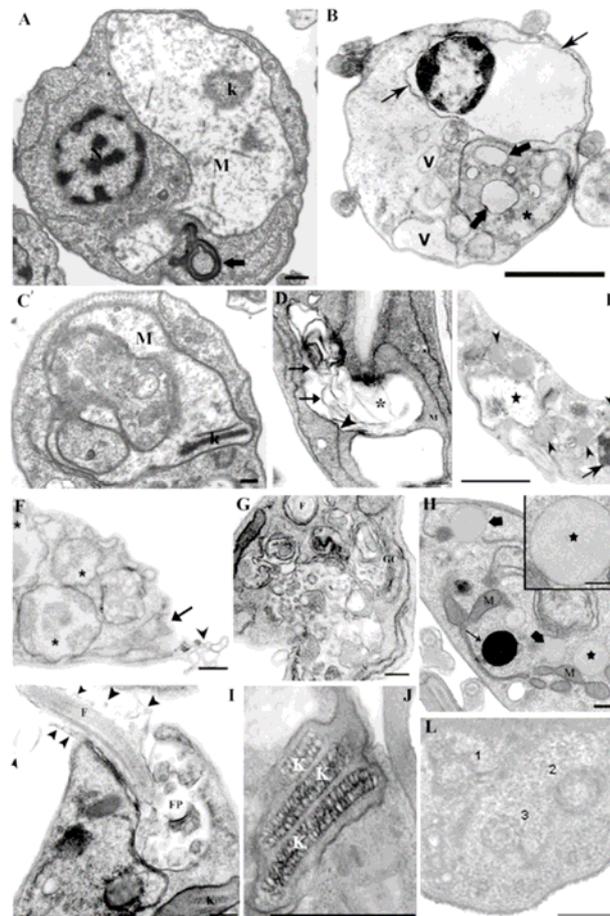
Natural products like plant-derived drugs, essential oils and animal venoms have remarkable effects on protozoa. Proanthocyanidin (an ethanolic extract from the *Kola acuminata* plant) seems to drastically increase the *T. brucei* rough ER content and the Golgi apparatus, which present up to seven to eight cristae [108]. In addition to inducing ER profiles surrounding cytoplasmic membrane structures,  $\beta$ -lapachone derivatives also induced remarkable Golgi alterations, like disruption and enlargement of the *trans*-Golgi network cisternae [55, 56]. Similarly, GG-OH treatment also caused effects on *T. cruzi* such as ER profiles surrounding organelles and myelin-like figures [72], suggesting an autophagic death pathway in response to both compounds. Dilation of the Golgi complex cisternae is also one of the effects of Brazilian green propolis on *T. cruzi* epimastigotes [109].

### 2.7. Endocytic/ Exocytic Related Organelles

The survival of trypanosomatids in distinct environments requires exogenous molecules that are internalized by fluid-phase and receptor-mediated endocytosis [110-113]. The endocytic pathway in trypanosomatids presents a singular architecture, in which the intracellular itinerary and delivery of internalized molecules vary significantly according to the developmental form analyzed [114, 115]. In trypomastigote forms of *T. brucei*, the endocytic/exocytic apparatus are restricted to the posterior region of the cell between the flagellar pocket and the nucleus. However, in epimastigotes of *T. cruzi* and promastigotes of *Leishmania*, molecules that enter the cytostome or are internalized from the flagellar pocket pass through a network of tubules and vesicles extending from the anterior to the posterior end of the parasite [112, 116-118]. The nature and the morphological aspect of the compartments of the endocytic/exocytic pathway in trypanosomatids vary according the species analyzed. In African trypanosomes, the compartments are similar to those described in mammals, including the presence of lysosomes. *Leishmania* and *T. cruzi*, however, present different compartments that are potential drug targets.

Aromatic diamidines, such as pentamidine, caused remarkable changes in the flagellar pocket of amastigotes from *L. tropica* [12] and trypomastigotes of *T. rhodesiense* [119]. The flagellar pockets were frequently dilated and filled with double membrane-bound bodies that budded from the flagellar pocket membrane. The same phenomenon was also observed in promastigotes of *L. amazonensis* after incubation in the presence of azasterol and squalene synthase inhibitors, suggesting alterations in the secretory pathway [41, 44].

The lysophospholipid analogues (LPAs) edelfosine, miltefosine and ilmofosine, in addition to inducing the formation of vesicles and myelin-like figures in the flagellar



**Fig. (2).** Morphological alterations of parasites after different drug treatments. (A) An *L. amazonensis* promastigote treated with an SMT inhibitor for 96 h displaying a swollen mitochondrion and kinetoplast, altered nuclear chromatin distribution and presence of RE profiles (thick arrow). (B) Trypomastigote forms treated with naphthofuranquinone presenting mitochondrial swelling with intra-mitochondrial vesicle formation (thick arrows), increased cytoplasmic vacuoles (V), and strong nuclear envelope dilation (thin arrows). (C) *L. amazonensis* promastigotes showing intense mitochondrion swelling after  $\Delta^{24(25)}$  sterol methyltransferase inhibitor incubation. (D) *L. amazonensis* promastigotes forms presenting altered mitochondria with intense swelling and a less electron-dense matrix (arrows), alterations in the mitochondrial membranes such as the separation of the inner and outer membranes (arrowheads), and the presence of some concentric membranes and myelin figures in the matrix (arrows). (E) Naphthoimidazole (derived from  $\beta$ -lapachone) treatment leads to kDNA disorganization, swelling of the mitochondrion (asterisk), a decrease in the electron density of acidocalcisomes (arrowheads) and abnormal chromatin condensation (arrow). (F) Epimastigotes treated with edelfosine plus ketoconazole display alterations in the mitochondrion (arrow), plasma membrane (arrowheads), and appearance of multinucleated parasites (asterisks). (G) *L. amazonensis* promastigotes treated with 3  $\mu$ M BPQ-OH for 24 h display large vacuole-containing vesicles with a part of the cytoplasm, and some alterations in the Golgi complex (arrowheads). (H) *L. amazonensis* promastigotes treated with an SQS inhibitor showing the presence of many lipid droplets with distinct morphologies in the cytoplasm, a population of lipid bodies surrounded by a monolayer (thick arrows and star), and the presence of increased numbers of electron-dense inclusions, confirming the alteration in the sterol content. (I) *L. amazonensis* promastigotes showing several alterations in the flagellar membrane (arrowheads) after BPQ-OH treatment. (J) Some epimastigotes treated with the alkaloid piperine display triple k-DNA without complete division of the parasite. (L) Suramin treatment results in differentiation of trypomastigotes, which present up to three basal bodies. N, nucleus; K, kinetoplast; M, mitochondrion; F, flagellum. Bars: A, C: 6  $\mu$ m; B, D, E: 2  $\mu$ m; F: 0.25  $\mu$ m; G: 0.15  $\mu$ m; H: 0.5  $\mu$ m; J, I: 1  $\mu$ m; L: 0.3  $\mu$ m. (A) Courtesy of J.C. Rodrigues; (B) Image reproduced with permission from Ref. [58] © (2009) Elsevier; (C) Courtesy of J.C. Rodrigues. (D) Image reproduced with permission from Ref. [40] © (2005) Elsevier; (E) Image reproduced with permission from Ref. [55] © (2005) Oxford University Press; (F) Image reproduced with permission from Ref. [51] © (2005) Oxford University Press; (G) Image reproduced with permission from Ref. [40] © (2005) Elsevier; (H) Image reproduced with permission from Ref. [41] © (2007) American Society for Microbiology; (I) Image reproduced with permission from Ref. [40] © (2005); (J) Image reproduced with permission from Ref. [84] © (2008) Springer-Verlag; (L) Image reproduced with permission from Ref. [92] © (2008) Elsevier.

pocket of *L. amazonensis* promastigotes [50], also induce morphological alterations in the reservosomes in epimastigotes of *T. cruzi*, which are characterized by swelling and the concentration of several reservosomes near the nucleus [51]. Reservosomes are also the main targets of cysteine protease antagonists. After incubation of epimastigotes in the presence of Z-(SBz)Cys-Phe-CHN<sub>2</sub>, an irreversible cysteine-protease inhibitor, reservosomes became enlarged and more electron-dense [120].

Treatment with  $\beta$ -lapachone derivatives, anti-microtubule agents, risedronate or propolis induced various alterations in reservosome ultrastructure characterized by marked alterations in their morphology and in their electron density, due to inhibition of endocytic activity and/or to the increased degradation of the protein matrix. The presence of electron-lucent rod-shaped inclusions was observed [56, 73, 74, 103, 109, 121].

Active plant components also interfere with compartments of the endocytic pathway in trypanosomatids. The proanthocyanidin from *Kola acuminata* caused enlargement of the flagellar pocket and of the lysosome-like structures as well as the formation of multivesicular bodies in bloodstream *T. brucei* [108]. Flagellar pocket swelling was observed in *L. chagasi* promastigotes treated with *Cymbopogon citratus* essential oil [122].

## 2.8. Acidocalcisomes

The acidocalcisome is an acidic electron-dense organelle enclosed by a single membrane that is found in all members of the Trypanosomatidae family. The number and size of acidocalcisomes in a cell varies, and they can be observed in all developmental forms of *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania*. The electron-dense matrix contains sodium, magnesium, potassium, calcium, zinc, iron and phosphorous in the form of inorganic pyrophosphate and polyphosphate, as determined by electron microscopy microanalysis and energy-filtered transmission electron microscopy. In addition to storing the ions listed above, acidocalcisomes are also involved in pH homeostasis and osmoregulation. In some protozoan parasites (including trypanosomatids), the acidocalcisomes present enzymes that are not found or different from those found in mammals, such as the vacuolar proton translocating pyrophosphatase (V-H<sup>+</sup>-PPase) and a soluble inorganic pyrophosphatase (PPase) [123,124]. They are inhibited by various bisphosphonate pyrophosphate analogues, some of which are commercially available for the treatment of bone resorption diseases.

Aromatic diamidines, such as furamidine and the other fluorescent compounds suramine and chloroquine, were observed to accumulate in the acidocalcisomes of *T. brucei* [30, 31, 125]. Naphthoimidazole N1, a  $\beta$ -lapachone derivative, caused a decrease in the electron density of acidocalcisomes in *T. cruzi* trypomastigotes [55]. The most evident effect on the ultrastructure of acidocalcisomes was described in *Leishmania amazonensis* after treatment with the SBIs ketoconazole and terbinafine. The authors described a change in electron density of the cytoplasm, an increase in volume and in the number of the organelles, and the presence of acidocalcisome cores inside large vacuoles presenting characteristic autophagic-like structures. This last feature was also

observed after incubation of *Leishmania* with the SBI 22, 26-azasterol [44]. An increase in acidocalcisome volume was also observed after incubation of *L. chagasi* promastigotes in the presence of essential oil from *C. citratus*, *Lippia sidoides*, and *Ocimum gratissimum* [122].

## 2.9. Glycosomes

Glycosomes are spherical or elongated structures with a homogeneous matrix surrounded by a single membrane. Most of the glycolytic pathway of trypanosomatids takes place in this organelle [126]. Besides glycolytic activity, which in trypanosomatids plays an essential role in their ATP supply, other metabolic pathways have been described to occur in glycosomes, such as isoprenoid and sterol biosynthesis. The enzymes in the glycosomes that participate in the different metabolic pathways are structurally and kinetically different from those observed in mammalian hosts, making the glycosomes a promising target for new drugs against parasitic trypanosomatid protozoa. Glycosomes in monoxenous trypanosomatids also contain catalase and are thus considered a special type of peroxisome.

Ultrastructural changes in glycosomes have been described only after incubation in the presence of the SB inhibitor terbinafine, which caused an increase in the number of glycosomes in epimastigotes of *T. cruzi* [37]. The authors also observed glycosomes arranged in stacks after 144 h of treatment.

## FINAL REMARKS

Cell biology studies using electron microscopy have made important contributions to the identification of main targets for different drugs against trypanosomatids and to revealing their effects at the cellular level. New synthetic and natural compounds used in nanomolar concentrations and combinations of new and old drugs have been successfully used. In addition to the most commonly observed effects, which are mitochondrial swelling and cytoplasm vacuolization, some drugs cause a complex sequence of ultrastructural damage, indicating the progression of apoptosis-like and autophagic cell death in *Leishmania* and *T. cruzi* [127-128].

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors are grateful to Dr. Juliany Colla Fernandes Rodrigues and Dr. Wanderley de Souza for kindly providing some of the micrographs observed in Fig. (2). This review is in celebration of the 100th anniversary of the discovery of Chagas disease.

## REFERENCES

- [1] Trouiller P, Torreele E, Olliaro P, et al. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? *Trop Med Int Health* 2001; 6: 945-51.
- [2] Reddy M, Gill SS, Kalkar SR, Wu W, Anderson PJ, Rochon PA. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases: a systematic review. *JAMA* 2007; 298: 1911-24.

- [3] De Azevedo Jr WF, Soares MBP. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 193-201.
- [4] Docampo R, Moreno SNJ. Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 2003; 90: S10-13.
- [5] Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components- a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol* 2005; 21: 462-8.
- [6] Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EAF, Oliveira J, Diniz CG, Farias LM, de Carvalho MAR, Maria WS, Sanchez EF, Borges A, Chavez-Olortegui C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 2009; 53: 330-41.
- [7] Soeiro MNC, Dantas AP, Daliry A, et al. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from *in vivo* and *in vitro* studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 301-10.
- [8] De Souza W. Electron microscopy of trypanosomes – A historical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 313-25.
- [9] De Souza W, Rodrigues JCF. Sterol Biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 1-9.
- [10] Vannier-Santos MA, De Castro SL. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 246-60.
- [11] Williamson J, Macadam RF, Dixon H. Drug-induced lesions in trypanosome fine structure: a guide to modes of trypanocidal action. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 147-51.
- [12] Hentzer B, Kobayasi T. The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. *Ann Trop Med Parasitol* 1977; 71: 157-66.
- [13] Croft SL, Brazil RP. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol* 1982; 76: 37-43.
- [14] Gadella FR, Moreno SNJ, De Souza W, Crus FS, Docampo R. The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 34: 117-26.
- [15] Soeiro MNC, De Castro SL, De Souza EM, Batista DGJ, Silva CF, Boykin DW. Diamidines activity upon trypanosomes: the state of the art. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1: 151-61.
- [16] Oliaro P, Guerin P, Gerstl S, Haaskjold A, Rottingen J, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 763-74.
- [17] Werbovets K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 147-57.
- [18] De Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, et al. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 593-600.
- [19] Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, et al. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and Db820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2185-91.
- [20] De Souza EM, Oliveira GM, Boykin DW, Kumar A, Hu Q, Soeiro MN. Trypanocidal activity of the phenyl-substituted analogue of furamide DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 610-4.
- [21] De Souza EM, Menna-Barreto RFS, Araújo-Jorge TC, et al. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2006; 133: 75-9.
- [22] Silva CF, Batista MM, Mota RA, et al. Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1939-346.
- [23] Silva CF, Batista MM, De Souza EM, et al. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3803-9.
- [24] Silva CF, Batista MM, Batista DG, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3307-14.
- [25] Pacheco MG, Da Silva CF, Da Souza EM, et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of heterocyclic cationic molecules *in vitro*. *Exp Parasitol* 2009; 123: 73-80.
- [26] Daliry A, Da Silva PB, Da Silva CF, et al. *In vitro* analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 747-50.
- [27] Langreth SG, Berman JD, Riordan GP, Lee LS. Fine-structural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs *in vitro*. *J Protozool* 1983; 30: 555-61.
- [28] Fusai T, Boulard Y, Durand R, et al. Ultrastructural changes in parasites induced by nanoparticle-bound pentamidine in a *Leishmania major*/mouse model. *Parasite* 1997; 4: 133-9.
- [29] Loiseau PM, Mbongo N, Bories C, Boulard Y, Craciunescu DG. *In vivo* antileishmanial action of Ir-(COD)-pentamidine tetraphenylborate on *Leishmania donovani* and *Leishmania major* mouse models. *Parasite* 2000; 7: 103-8.
- [30] Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, et al. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and Db820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2185-91.
- [31] Mathis AM, Bridges AS, Ismail MA, et al. Diphenyl furans and aza analogs: effects of structural modification on *in vitro* activity, DNA binding, and accumulation and distribution in trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2801-10.
- [32] Lanteri CA, Tidwell RR, Meshnick SR. The mitochondrion is a site of Trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 875-82.
- [33] Barrett-Bee K, Ryder N. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition. In: Sutcliffe J, Georgopapadakou NH, Ed. *Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy* 1992; 410-36.
- [34] Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Ann Rev Pharm Toxicol* 1998; 38: 375-88.
- [35] Charlton-Menys V, Durrington PN. Squalene synthase inhibitors: clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. *Drugs* 2007; 67: 11-6.
- [36] Rodrigues CO, Catisti R, Uyemura SA, et al. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization. *J Eukaryot Microbiol* 2001; 48: 588-94.
- [37] Lazard K, Urbina JA, and De Souza W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2097-105.
- [38] Vannier-Santos MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, De Souza W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42: 337-46.
- [39] Braga MV, Urbina JA, de Souza W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 72-8.
- [40] Rodrigues JC, Urbina JA, de Souza W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* 2005; 111: 230-8.
- [41] Rodrigues JCF, Concepcion JL, Rodrigues C, Caldera A, Urbina JA, de Souza W. *In vitro* Activities of ER-119884 and E5700, Two Potent Squalene Synthase Inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: Antiproliferative, Biochemical, and Ultrastructural Effects. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 4098-114.
- [42] Granthon AC, Braga MV, Rodrigues JCF, et al. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. *Vet Parasitol* 2007; 146: 25-34.
- [43] Vivas J, Urbina JA, De Souza W. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by  $\Delta^{24(25)}$  sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Int J Antimicrob Agents* 1996; 7: 235-40.
- [44] Rodrigues JC, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, de Souza W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 487-99.
- [45] Magaraci F, Jimenez CJ, Rodrigues C, et al. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem* 2003; 46: 4714-27.
- [46] Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, de Souza W. Effects of inhibitors of  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 2005; 11: 506-15.

- [47] Docampo R, Moreno SNJ, Turrens JF, Katzin AM, Gonzalea-Cappa SM, Stoppani AOM. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1981; 3: 169-80.
- [48] Jendrossek V, Handrick R. Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitizers. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3: 343-53.
- [49] Urbina J. Mechanism of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 1: S9-16.
- [50] Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 704-10.
- [51] Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 780-4.
- [52] Santa-Rita RM, Barbosa HS, de Castro SL. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2006; 100: 187-90.
- [53] Pinto AV, Menna-Barreto RFS, De Castro SL. Naphthoquinones isolated from *Tabebuia*: a review about the synthesis of heterocyclic derivatives, screening against *Trypanosoma cruzi* and correlation structure-trypanocidal activity. In: Govil JN, Singh VK, Bhardwaj R, Ed. *Recent Progress in Medicinal Plants, Phytomedicines* 2007; 16: pp. 112-27.
- [54] Docampo R, Lopes JN, Cruz FS, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by  $\beta$ -lapachone. *Exp Parasitol* 1977; 42: 142-9.
- [55] Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1034-41.
- [56] Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from  $\beta$ -lapachone. *Parasitol Res* 2007; 101: 895-905.
- [57] Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol* 2009; 136: 499-510.
- [58] Menna-Barreto RFS, Gonçalves RLS, Costa EM, et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Rad Biol & Med* 2009; 47: 644-53.
- [59] Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 695-729.
- [60] Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 84: 111-21.
- [61] Carrillo C, Cejas S, Huber A, González NS, Algranati ID. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50: 312-6.
- [62] Carrillo C, Canepa GE, Algranati ID, Pereira CA. Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 936-40.
- [63] Steglich C, Schaeffer SW. The ornithine decarboxylase gene of *Trypanosoma brucei*: Evidence for horizontal gene transfer from a vertebrate source. *Infect Genet Evol* 2006; 6: 205-19.
- [64] Bitonti AJ, McCann, PP, Bacchi CJ, Sjoerdsma A. Polyamine biosynthesis as a target for the chemotherapy of trypanosomatid infection. In: Coombs GH, North MJ, Ed. *Biochemical Protozoology* 1991; pp. 503-12.
- [65] Gradoni L, Iorio MA, Gramiccia M, Orsini S. *In vivo* effect of eflornithine (DFMO) and some related compounds on *Leishmania*. *Farmacol* 1989; 44: 1157-66.
- [66] Baumann RJ, Hanson WL, McCann PP, Sjoerdsma A, Bitonti AJ. Suppression of both antimony-susceptible and antimony-resistant *Leishmania donovani* by a bis(benzyl)polyamine analog. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 722-7.
- [67] Menezes D, Valentim C, Oliveira MF, Vannier-Santos MA. Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2006; 98: 99-105.
- [68] Vannier-Santos MA, Menezes D, Oliveira MF, de Mello FG. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiol* 2008; 154: 3104-11.
- [69] Rosa MS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1895-901.
- [70] De Carvalho EA, Andrade PP, Silva NH, Pereira EC, Figueiredo RC. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. *Micron* 2005; 36:155-61.
- [71] Kossuga MH, Nascimento AM, Reimão JQ, et al. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. *J Nat Prod* 2008; 71: 334-9.
- [72] Menna-Barreto RFS, Laranja GAT, Silva MCC, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res* 2008; 103: 111-7.
- [73] Dantas AP, Salomão K, Barbosa HS, De Castro SL. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 207-11.
- [74] Dantas AP, Barbosa HS, De Castro SL. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent Taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J Submicroscop Cythol Pathol* 2003; 35: 287-94.
- [75] Traub-Cseko YM, Ramalho-Ortigão JM, Dantas AP, de Castro SL, Barbosa HS, Downing KH. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol* 2001; 17: 136-41.
- [76] Valdez RH, Tonin LT, Ueda-Nakamura T, et al. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2009; 110: 7-14.
- [77] Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MA, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1234-41.
- [78] Luize PS, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, et al. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic epomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2006; 100: 31-7.
- [79] De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 1984; 86: 197-283.
- [80] Motta MC. Kinetoplast as a potential chemotherapeutic target of trypanosomatids. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 847-54.
- [81] Soeiro MNC, de Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13:105-21.
- [82] Cavalcanti DP, Fragozo SP, Goldenberg S, de Souza W, Motta MC. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. *Parasitol Res* 2004; 94: 439-48.
- [83] Gonzales-Perdomo M, de Castro SL, Meirelles MN, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1707-14.
- [84] Freire-de-Lima L, Ribeiro TS, Rocha GM, et al. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. *Parasitol Res* 2008; 102: 1059-67.
- [85] Batista DGJ, Pacheco MGO, Kumar A, et al. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol* 2009; 21: 1-9.
- [86] Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicol* 2008; 52: 13-21.
- [87] Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Mendonça LZ, Soares MJ. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2007; 116: 283-90.
- [88] Adade CM, Figueiredo RCBQ, De Castro SL, Soares MJ. Effect of  $\gamma$ -leucine methyl ester on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2007; 101: 69-79.
- [89] Kerschmann RL, Wolfson JS, McHugh GL, Dickersin GR, Hooper DC, Swartz MN. Novobiocin-induced ultrastructural changes and

- antagonism of DNA synthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes growing in cell-free medium. *J Protozool* 1989; 36: 14-20.
- [90] Savoia D, Alice T, Tovo PA. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 92-4.
- [91] Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, et al. HIV Aspartyl peptidase Inhibitors Interfere with Cellular Proliferation, Ultrastructure and Macrophage Infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 2009; 4: 1-11.
- [92] Bisaggio DF, Adade CM, Souto-Pradrón T. *In vitro* effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 282-6.
- [93] Borges VM, Lopes UG, de Souza W, Vannier-Santos MA. Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Res* 2005; 95: 90-6.
- [94] De Souza W. Components of the Cell surface of Trypanosomatids. *Progr Protistol* 1989; 3: 87-184.
- [95] McGwire BS, Olson CL, Tack BF, Engman DM. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Dis* 2003; 188: 146-52.
- [96] Madison MN, Kleshchenko YY, Nde PN, Simmons KJ, Lima MF, Villalta F. Human defensin alpha-1 causes *Trypanosoma cruzi* membrane pore formation and induces DNA fragmentation, which leads to trypanosome destruction. *Infect Immun*. 2007; 75: 4780-91.
- [97] Luque-Ortega JR, Saugar JM, Chiva C, Andreu D, Rivas L. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem J* 2003; 375: 221-30.
- [98] Bisaggio DF, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Souto-Pradrón T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol Res* 2003; 91(4): 273-82.
- [99] Bisaggio DF, Campanati L, Pinto RC, Souto-Pradrón T. Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Trop* 2006; 98: 162-75.
- [100] Souto-Pradrón T, Cunha e Silva NL, de Souza W. Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 517-28.
- [101] De Souza W, Miranda K, Cunha e Silva NL, Souto-Pradrón T. A review on the ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. In: Teixeira A, Vinaud M, Castro AM, Ed. *Emerging Chagas Disease* 2009; pp. 40-62.
- [102] Havens CG, Bryant N, Asher L, et al. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 110: 223-36.
- [103] Bogitsh BJ, Middleton OL, Ribeiro-Rodrigues R. Effects of the antitubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* 1999; 85: 475-80.
- [104] Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh L, Baiton DF, McKerrow JH. Growth arrest of *T. cruzi* by cysteine protease inhibitors is accompanied by alterations in Golgi complex and ER ultrastructure. *J Cell Sci* 1998; 111: 597-606.
- [105] Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh L, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1998; 188: 725-34.
- [106] Engel JC, Garcia CT, Hsieh L, Doyle PS, McKerrow JH. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 2000; 113: 1345-54.
- [107] Braga VB, de Souza W. Effects on protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 209-16.
- [108] Kubata BK, Nagamune K, Murakami N, et al. Kola acuminata proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol*. 2005; 35: 91-103.
- [109] Salomão K, de Souza EM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Brazilian Green Propolis: Effects *In vitro* and *In vivo* on *Trypanosoma cruzi*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; eCAM: 1-12 doi:10.1093/ecam/nep014.
- [110] De Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva N. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Prog Histochem Cytochem* 2009; 44: 67-124.
- [111] Coppens I, Opperdoes FR, Courtoy PJ, Baudhuin P. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* 1987; 34: 465-73.
- [112] Webster P. Endocytosis by African trypanosomes. I. Three-dimensional structure of the endocytic organelles in *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. *Eur J Cell Biol* 1989; 49: 295-302.
- [113] Soares MJ, De Souza W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1991; 77: 461-8.
- [114] Clayton C, Hausler T, Blattner J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Rev* 1995; 59: 325-44.
- [115] McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 122-54.
- [116] Webster P, Fish WR. Endocytosis in African trypanosomes. II. Occurrence in different life-cycle stages and intracellular sorting. *Eur J Cell Biol* 1989; 49: 3003-10.
- [117] Porto-Carreiro I, Atrias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 858-69.
- [118] Weise F, Stierhof YD, Kuhn C, Weise M, Overath P. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasites *Leishmania* based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* 2000; 113: 4587-603.
- [119] MacAdam RF, Williamson J. The effect of drugs on the fine-structure of trypanosomes. *Parasitol* 1967; 57: 21-2.
- [120] Yong V, Schmitz V, Vannier-Santos MA, et al. Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteases. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 109: 47-59.
- [121] Garzoni LR, Caldera A, Meirelles MNL, et al. Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risnedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 273-85.
- [122] Oliveira VCS, Moura DMS, Lopes JAD, Andrade PP, da Silva NH, Figueiredo RCBQ. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L., on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol Res* 2009; 104: 1053-9.
- [123] Miranda K, Docampo R, Grillo O, de Souza W. Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist* 2004; 155: 395-405.
- [124] Moreno SN, Docampo R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol* 2009; 56: 208-13.
- [125] Coppens I, Baudhuin P, Opperdoes FR, Courtoy PJ. Role of acidic compartments in *Trypanosoma brucei*, with special reference to low-density lipoprotein processing. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58: 223-32.
- [126] Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 1977; 15: 80: 360-4.
- [127] Menna-Barreto RF, Salomão K, Dantas AP, et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 2009; 40: 157-68.
- [128] Rodrigues JC, de Souza W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 925-38.

Received: November 15, 2009

Revised: April 21, 2010

Accepted: April 22, 2010

© Adade and Souto-Pradrón; licensee Bentham Open.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



## Short communication

In vitro effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*Danielle Frias Ribeiro Bisaggio<sup>a</sup>, Camila Marques Adade<sup>b</sup>, Thaïs Souto-Padrón<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil<sup>b</sup> Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil

Received 20 July 2007; accepted 6 November 2007

## Abstract

Suramin has been previously reported to inhibit distinct cellular enzymes and to affect the synthesis and distribution of cytoskeleton proteins, cell differentiation and proliferation. The present study indicates that prolonged incubation of *Trypanosoma cruzi*-infected cells in the presence of 500  $\mu$ M suramin during intracellular development of the parasite causes morphological changes in amastigote and trypomastigote forms related to the cell division and differentiation process. Our results also show that trypomastigotes obtained from suramin-treated host cells were significantly less infective than control parasites and that amastigotes derived from those trypomastigote forms were less proliferative. © 2007 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

**Keywords:** Suramin; *Trypanosoma cruzi*; Ultrastructure; Parasite–host cell interaction

## 1. Introduction

*Trypanosoma cruzi* is a parasitic protozoan belonging to the Trypanosomatidae family and is the aetiological agent of Chagas disease, a debilitating disease that is highly prevalent in Latin America with no immunoprophylactic agents available [1].

Standard chemotherapy regimens for Chagas disease possess limited efficacy during the acute and chronic phases and produce serious side effects. Therefore, new drugs have been developed based on the basic biology of *T. cruzi*. Among them are inhibitors of proteases and unique biochemical routes that have trypanocidal activity in vitro against intracellular amastigotes [2].

Suramin, a symmetrical polysulphonated derivative of urea, is an efficient drug in the prophylactic treatment of human trypanosomiasis in Africa. Suramin affects different proteins in different cell types, including the reverse transcriptase of retroviruses, protein kinase C, DNA polymerase, protein tyrosine phosphatases, lysosomal enzymes, ATPases and cytoskeleton components [3–6]. Furthermore, it acts as an antagonist of P<sub>2x</sub> and P<sub>2y</sub> purinoceptors and

inhibits the binding of some growth factors to their receptors, which stimulated its use in cancer chemotherapy [7]. In trypanosomes, suramin inhibits several enzymes, endocytosis of some molecules and the binding of low-density lipoproteins to specific receptors [3,8], changes in the phenotypic expression of surface antigens and a redistribution of cell surface negative charges [3,5,9]. In the present study, we investigated under standardised conditions the in vitro activity of suramin against *T. cruzi*, taking into account the intracellular development and infectivity of trypomastigote forms.

## 2. Material and methods

## 2.1. Parasite

The Y strain of *T. cruzi* was used throughout this study. Tissue culture amastigotes and trypomastigotes were obtained from the supernatant of LLC-MK<sub>2</sub> cells as described previously [9].

## 2.2. Suramin

Suramin sodium salt was obtained from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Stock solutions of 10 mM were

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 6738; fax: +55 21 2260 2364. E-mail address: soutu.padrone@micro.ufrj.br (T. Souto-Padrón).

prepared by dissolving the compound in RPMI medium and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Final solutions were made in RPMI medium prior to each experiment.

### 2.3. Suramin treatment

After an infection period of 24 h, when all internalised trypanomastigote forms were transformed into amastigote forms, host cells were rinsed twice and then incubated in RPMI-1640 medium supplemented with 2% foetal calf serum (FCS) containing  $500\ \mu\text{M}$  of suramin as previously described [9]. Trypomastigotes differentiated in the presence of suramin were named TDS, whilst control trypomastigotes were named WT. Since the population of intracellular parasites does not differentiate synchronously, amastigote forms could also be harvested from the cell culture either in control or suramin-treated host cells. Amastigotes obtained from suramin-treated LLC-MK<sub>2</sub> cells were named amastigotes grown with suramin (AGS).

### 2.4. Parasite smears

Control, TDS and AGS parasites were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, spread onto a glass slide, air dried, dehydrated in methanol and stained with Giemsa. The cells were observed in a Zeiss Axioplan 2 light microscope and images were acquired with a Colour View XS digital video camera.

### 2.5. Parasite invasion assays

WT and TDS parasites were used for parasite invasion assays. Experiments were performed in 24-well plates containing 13 mm diameter, round, glass coverslips coated with  $1.0 \times 10^5$  LLC-MK<sub>2</sub> cells, using a multiplicity of infection of 10. After a 3 h incubation period at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere, extracellular parasites were removed by repeated washes and the cells were cultivated for an additional 3–4 days in RPMI-1640 containing 2% FCS. Following washes in PBS, the coverslips were fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa and mounted on glass slides with Permount (Fischer Scientific, New Jersey, USA). The percentage of infected cells was estimated by counting under a light microscope. All invasion assays were performed in triplicate, in at least three independent experiments and in the absence of suramin.

### 2.6. Transmission electron microscopy

Control and treated parasites were fixed in 4% formaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) plus 5 mM calcium chloride for 1 h at room temperature. Cells were post-fixed, dehydrated and embedded as previously described [9]. Ultrathin sections obtained with a Reichert UltraCut S ultramicrotome were stained with

uranyl acetate and lead citrate and then analysed and photographed in a FEI Morgagni F 268 transmission electron microscope.

## 3. Results and discussion

Suramin is currently used for the prophylactic treatment of African trypanosomiasis. Although suramin has not been used in Chagas disease, an *in vivo* study showed a significant suppressive action on *T. cruzi* infection in mice [10]. The mechanism of action of suramin is not completely understood but it is mainly attributed to the presence of six negative charges that interact with different serum and cell proteins [3].

In contrast to that described for African trypanosomes [11], only prolonged incubation of *T. cruzi* caused morphological and physiological changes in the parasite [9]. Since tryptomastigotes cannot be maintained for long periods in axenic media at  $37^{\circ}\text{C}$  without transforming into amastigotes, we developed a protocol in which suramin was introduced in the host cell culture medium 24 h after infection and maintained during completion of the parasite intracellular cell cycle [9]. The rationale for this experimental protocol is based on the fact that suramin is not only taken up by the cells [8,12] but also gains access to the cytoplasm where it could accumulate in a sufficient concentration to cause toxic effects to the amastigote and tryptomastigote forms.

Morphological analysis of TDS and AGS parasites released 5–7 days post infection showed that they presented different grades of morphological changes (Figs. 1 and 2) mainly related to unfinished amastigote–tryptomastigote differentiation and cytokinesis (Fig. 1B–F), as previously described for African trypanosomes, streptococci and clostridia, sea urchin eggs and young roots of *Vicia fava* [11]. Many binucleated forms were observed, suggesting that division of the cytoplasm had been inhibited before that of the nucleus. Epimastigote-like forms with round kinetoplasts (Fig. 1B and C) and tryptomastigote forms with rod-like kinetoplasts (Fig. 1G) were observed. Most of the TDS and AGS parasites presented round kinetoplasts located side by side with the nucleus, suggesting that there was a delay in the process of kinetoplast migration from the anterior to the posterior end of the parasite (Figs. 1E–G and 2C). Changes in the nucleus shape were frequently observed (Fig. 2). In some parasites, an unfinished process of nucleus segregation was observed and the two new nuclei remained adhered to each other (Fig. 2E). Parasites in which nuclear division occurred but cell division was arrested presented two nuclei that were observed in different regions of the cell body (Figs. 1E,F and 2F). In contrast to most of the drugs used in *T. cruzi* chemotherapy, suramin did not cause changes in the mitochondrial structure (Fig. 2C).

Interestingly, the effects of suramin on *T. cruzi* described here were very similar to the alterations caused by blocking of the cytoskeleton associated with protein expression in

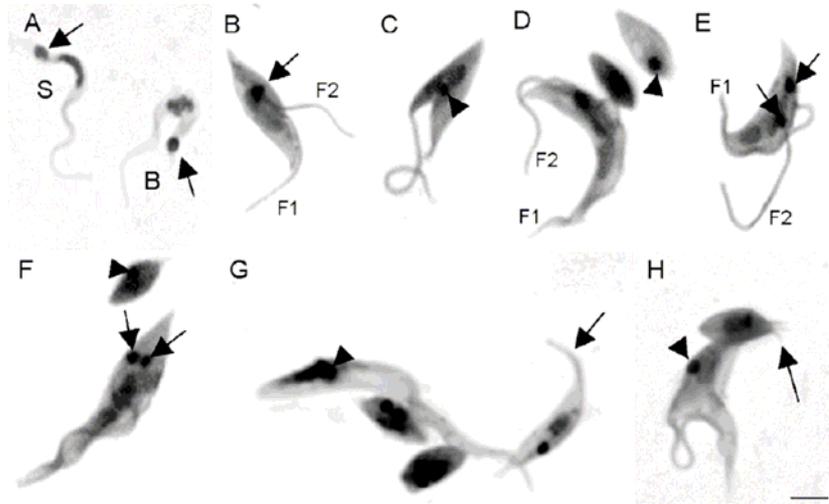


Fig. 1. Giemsa-stained smears of (A) control trypomastigotes (WT) and (B–H) trypomastigotes differentiated in the presence of suramin (TDS) and amastigotes grown with suramin (AGS). Slender (S) and broad (B) WT trypomastigotes present round kinetoplasts in the posterior end of the parasite (black arrow) and a central nucleus (white arrow) (A). TDS and AGS are bigger than WT parasites. This aspect is clearly observed, since all images have the same magnification. Many cells are in an unfinished process of cell body division and many are epimastigote-like forms (B–F). Bizarre forms are also observed (arrowhead in (H)). The kinetoplast is irregular, half rod-like, half round (arrow in (B)), there are parasites with two round kinetoplasts at different regions of the body (C–F), amastigote- and epimastigote-like forms presenting round kinetoplasts (arrowheads in (C, D, F and G)) and a trypomastigote-like form presenting a rod-like kinetoplast (arrowhead in (G)). Many cells presented two flagella that are adhered (F1 in (B–E)) or not adhered (F2 in (B and E)) to the parasite cell body. In some parasites they are shorter (arrow in (G)). An amastigote-like form presenting three flagella is observed in (H) (arrow). All bars represent 4  $\mu\text{m}$ .

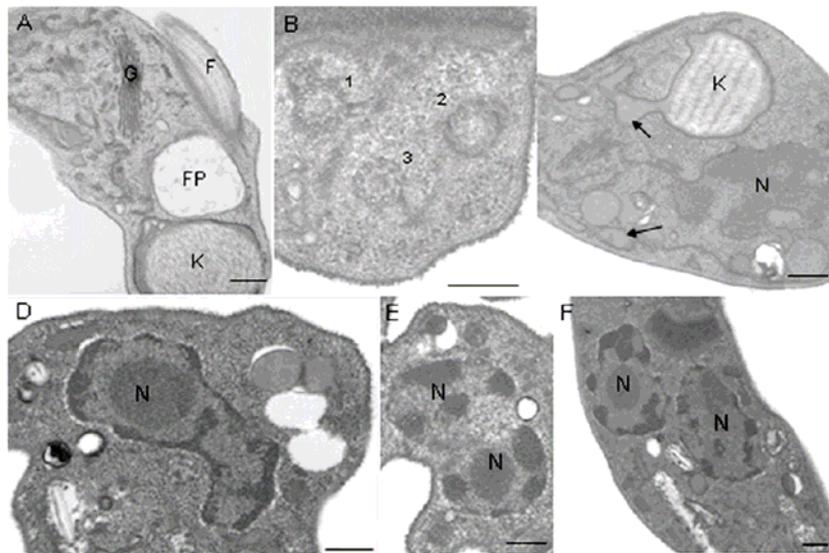


Fig. 2. Suramin induces organelle reorganisation in *Trypanosoma cruzi*. (A) General aspect of a control (WT) trypomastigote showing the round kinetoplast (K), the flagellar pocket (FP), the flagellum (F) and the golgi (G). (B) Trypomastigotes differentiated in the presence of suramin (TDS) presenting up to three basal bodies are observed. (C) Intermediary forms presenting a round kinetoplast (K) are frequently found in the central portion of the cell near the nucleus (N). No changes in mitochondrial ultrastructure are observed (arrows). (D–F) Most of the parasites presented irregular nuclei (D). Some effects are observed on the process of nuclear segregation after the division process and the two nuclei remain adhered (E) or very close (F). All bars represent 0.3  $\mu\text{m}$ .

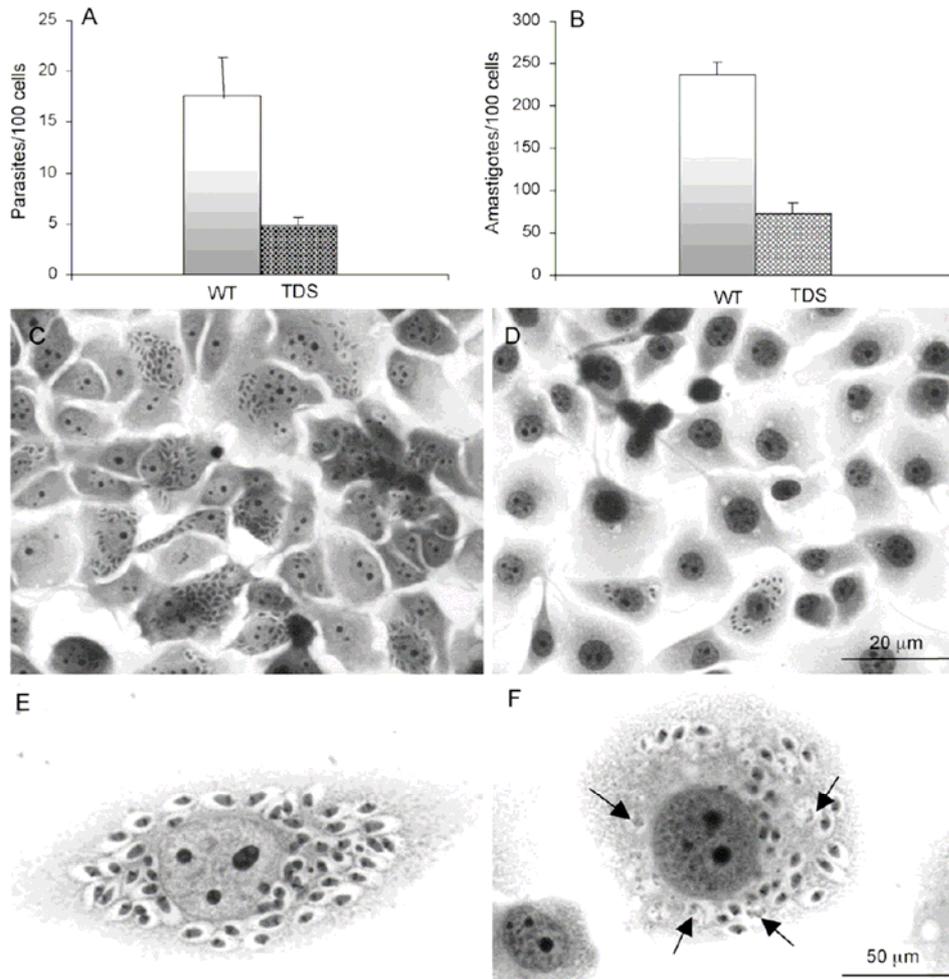


Fig. 3. Infective and proliferative characteristic of trypomastigotes differentiated in the presence of suramin (TDS) and amastigotes grown with suramin (AGS). (A) Cell invasion by control (WT) trypomastigotes and TDS parasites. There is a significant decrease in TDS invasion compared with WT trypomastigotes ( $P < 0.0012$ ). (B) After the invasion period described in (A), coverslips were rinsed to remove all free parasites and the cells were maintained for 72 h in the absence of suramin. There was a significant difference between the proliferation levels of WT and TDS parasites ( $P < 0.0054$ ). The values in (A) and (B) are mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. (C–F) LLC-MK<sub>2</sub> cells infected with WT trypomastigotes (C) presented 40% of infected cells, whereas in those cultures infected by TDS parasites (D) this percentage is 10%. (E,F) WT-infected cells present many amastigotes around the nuclei (E) whereas in TDS-infected cells there are fewer amastigotes. In some host cells, debris (small arrows) can be seen in the middle of the AGS parasites. The same magnifications, which are indicated in the figures, were used in (C–F).

African trypanosomes [13]. Although, the endocytic activities of *T. cruzi* trypomastigotes and amastigotes have not been well described, we believe that suramin can reach the parasite cytoplasm and bind to different proteins, inducing the morphological alterations described above.

Our results also indicate that TDS parasites were significantly less infective than WT trypomastigotes based on the number of parasites per 100 cells (Fig. 3A). In addition, we showed that the effect of suramin is maintained for several days after infection even in its absence, since the percentage of infected cells and the number of amastigotes observed in TDS-infected cells is smaller than that obtained in WT-

infected cells in the same post-infection period (Fig. 3B–D). This fact can be explained by the effect of suramin on parasite proliferation as described in other trypanosomatids [14] and is reinforced by the presence of cell debris in the host cell cytoplasm, which is indicative of amastigote degeneration and death (Fig. 3E and F).

Despite, the relative *in vivo* ineffectiveness of suramin and other drugs against *T. cruzi*, including those currently used in the chemotherapy of Chagas disease, the use of suramin contributes to the analysis of the cell biology of the parasite. Some of the results obtained in the present study are in agreement with those previously observed *in vivo* [10]. An

important aspect is that different isolates of *T. cruzi* have their own levels of susceptibility to different drugs [15] and the search for alternative treatments with different drug combinations may improve the effectiveness of treatment for Chagas disease.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Angela Hampshire Carvalho Lopes Santos for critical reading of the manuscript and Mr. David Graham Straker for revising the text.

**Funding:** Grant 472513/2006-0 from the Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; grants E-26/170.669/2005 and E-26/100.620/2007 from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil; and grant E-26/171.548/2006 from the Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Brazil.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

#### References

- [1] De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 1984;86:197–283.
- [2] Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 2003;19:494–501.
- [3] Voogd TE, Vansterkenburg EL, Wilting J, Janssen LH. Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev* 1993;45:177–203.
- [4] Zhang YL, Keng YF, Zhao Y, Wu L, Zhang ZY. Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1998;273:12281–7.
- [5] Bisaggio DFR, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Souto-Pradón T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite–host cell interaction. *Parasitol Res* 2003;91:273–82.
- [6] Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Lenzi P, Paparelli A. Suramin-induced ultrastructural changes in the testis of albino rats. *Exp Toxicol Pathol* 1996;48:299–305.
- [7] Kaur M, Reed E, Sartor O, Dahut W, Figg WD. Suramin's development: what did we learn? *Invest New Drug* 2002;20:209–19.
- [8] Vansterkenburg ELM, Coppens I, Wilting J, Bos OJ, Fischer MJ, Janssen LKH, et al. The uptake of the trypanocidal drug suramin in combination with low-density lipoproteins by *Trypanosoma brucei* and its possible mode of action. *Acta Trop* 1993;54:237–50.
- [9] Bisaggio DFR, Campanati L, Pinto RCV, Souto-Pradón T. Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum–cell body attachment region. *Acta Trop* 2006;98:162–75.
- [10] Seah S. The effect of suramin on experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Trop Med Hyg* 1970;73:170–1.
- [11] Hawking F. Suramin: with special reference to onchocerciasis. *Adv Pharmacol Chemother* 1978;15:289–322.
- [12] Pal A, Hall BS, Field MC. Evidence for a non-LDL-mediated entry route for the trypanocidal drug suramin in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:217–21.
- [13] Chanez A-L, Hehl AB, Engstler M, Schneider A. Ablation of the single dynamin of *T. brucei* blocks mitochondrial fission and endocytosis and leads to a precise cytokinesis arrest. *J Cell Sci* 2006;119:2968–74.
- [14] Hawking F, Sen AB. The trypanocidal action of homidium, quinapyramine and suramin. *Br J Pharmacol Chemother* 1960;15:567–70.
- [15] Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:755–9.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)