



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**NATHALIA SANTIAGO CEZAR ROSAS**

**EFEITOS DE VENENOS TOTAIS DE SERPENTES BRASILEIRAS  
SOBRE *Leishmania chagasi* E *Trypanosoma cruzi***

**FORTALEZA**

**2013**

**NATHALIA SANTIAGO CEZAR ROSAS**

**EFEITOS DE VENENOS TOTAIS DE SERPENTES BRASILEIRAS  
SOBRE *Leishmania chagasi* E *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

**FORTALEZA**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**Universidade Estadual do Ceará**  
**Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho**  
**Bibliotecário (a) Leila Cavalcante Sátiro – CRB-3 / 544**

R788e Rosas, Nathalia Santiago Cezar.

Efeitos de venenos totais de serpentes brasileiras sobre *Leishmania chagas* E *Trypanosoma cruzi* /Nathalia Santiago Cezar Rosas — 2013.

CD-ROM 80f. : il. (algumas color.); 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Mestrado Acadêmico em Veterinária, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Janaina serra Azul Monteiro Evangelista.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

1. *Crotalus*. 2. *Bothrops*. 3. Citotoxicidade. 4. *Leishmania chagasi*. 5. *Trypanosoma cruzi*. I. Título.

CDD: 636.089

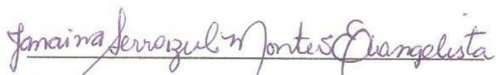
**NATHALIA SANTIAGO CEZAR ROSAS**

**EFEITOS DE VENENOS TOTAIS DE SERPENTES BRASILEIRAS  
SOBRE *Leishmania chagasi* E *Trypanosoma cruzi***

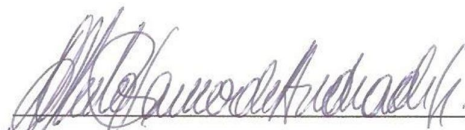
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 11 / 12 / 2013

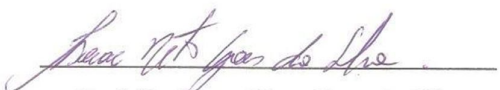
**BANCA EXAMINADORA**



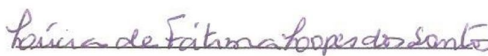
Prof.<sup>a</sup>. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro  
Evangelista  
(Orientadora)  
Universidade Estadual do Ceará - UECE



Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior  
(Examinador)  
Universidade de São Paulo – USP



Prof. Dr. Isaac Neto Goes da Silva  
(Examinador)  
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof.<sup>a</sup>. Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos  
Santos (Suplente)  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Dedico à minha mãe, Márcia Maria de  
Oliveira Santiago, minha fortaleza e maior  
Incentivadora, e à minha avó, Francisca  
de Oliveira Santiago, meu anjo da guarda.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV – UECE) e professores do programa pelo conhecimento repassado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante todo o curso.

Ao Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Venenos de Serpentes e Plantas da Universidade Estadual do Ceará (HISTOVESP - UECE) e todos seus integrantes.

Ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical pertencente a Universidade de São Paulo (IMT – USP).

Sobretudo agradeço a Deus por estar sempre comigo não me deixando cair e ser meu porto seguro. Obrigada Senhor!

A minha mãe, Marcia Maria de Oliveira Santiago, por todo apoio e incentivo. Motivo pelo qual enfrentei os obstáculos aparecidos e consegui chegar aqui.

A minha avó, Francisca de Oliveira Santiago, pelo apoio, conselhos e orações. Minha segunda mãe.

Ao meu esposo, Alano Gonçalves de Carvalho, pelo amor, compreensão, apoio e ombro amigo do meu lado em todos os momentos.

Ao meu irmão, Rodrigo Santiago Cezar Rosas, por sempre estar à disposição quando precisei.

Aos demais membros da minha família que me ajudaram e incentivaram a chegar aqui. Muito obrigada!

A minha irmã de coração, Lucelina da Silva Araújo. Sempre me deu força, conselhos e me escutou nos momentos de aflição. Amigos são irmãos que escolhemos.

A minha orientadora, Janaina Serra Azul Monteiro Evangelhista, por memo sem me conhecer me aceitou como orientada.

Agradeço ao professor Heitor Franco de Andrade Júnior por ter me acolhido em seu laboratório, pela parceria, pelo conhecimento repassado e pela orientação. Sou eternamente grata a essa pessoa simples e de coração grandioso.

Agradeço a professora Cláudia Maria Leal Bevilaqua pela sua grande contribuição neste trabalho e parceria.

Aos alunos de Iniciação Científica que me ajudaram nesse trabalho: André Luis Batista Figueiredo Rolim, Deborah Luiza Mendes Queiroz, Karen Denise da Silva Macambira e Anna Sérgia Mendonça Miranda Conceição.

Aos membros do Laboratório de Protozoologia da USP, em especial à Camila Aparecida Carvalho e Roselaine Pereira Alvim Cardoso. Aos demais membros que me ensinaram e ajudaram a desenvolver este trabalho: Andréia, Jaqueline, Thiago, Nayara, Andrés, Marina, Michel e a Professora Luciana.

A professora Jânia Maria do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Ceará e sua mestranda Sayonara que me acolheram e repassaram experiência.

Aos membros da banca e professores de grande admiração minha: Prof. Dr. Isaac Neto Goes da Silva (UECE), Prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos (UECE) e o Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior (USP).

Agradeço a minha eterna orientadora, Nilza Dutra Alves, que além de amiga, tenho uma grande admiração e me encaminhou para que chegasse aqui onde estou. Verdadeiro exemplo de professora em que sempre me espelho.

A meus colegas de pós-graduação pela convivência durante a trajetória do mestrado e por ter dividido comigo essa parte especial da minha vida.

Minha imensa gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

## RESUMO

Os venenos de serpentes peçonhentas vêm chamando atenção de pesquisadores por apresentarem substâncias ativas no desenvolvimento de fármacos contra diversas enfermidades. Possuem em sua maioria proteínas e peptídeos que decorrem de um contínuo processo evolutivo. No Brasil, apenas as famílias *Viperidae* e *Elapidae* são consideradas peçonhentas. Os gêneros *Crotalus* e *Bothrops* derivados da família *Viperidae* possuem uma grande variedade de compostos que já são usados em tratamentos médicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* dos venenos totais das serpentes *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Estes venenos foram testados em diversas concentrações. Para determinar a concentração inibitória de 50% dos parasitas ( $IC_{50}$ ) foi realizado o teste do MTT sobre células RAW 264.7 e LLC-MK2, promastigotas de *L. chagasi* e tripomastigotas de *T. cruzi*. Em amastigotas de *L. chagasi* e *T. cruzi* foi realizado o teste de ELISA *in situ*. Os venenos na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram 100% de letalidade sobre as células estudadas. Já a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  obteve menos de 50% de citotoxicidade. Os venenos apresentaram alta toxicidade em tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. A melhor  $IC_{50}$  em tripomastigotas foram de 81.5 à 213.0  $\mu\text{g/mL}$  e 77.9 à 293.8  $\mu\text{g/mL}$  em amastigotas de *T. cruzi* obtidos pelo veneno de *C. d. terrificus*. Em promastigotas, o veneno da *C. d. terrificus* provocou 71.1% de mortalidade na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  e a  $IC_{50}$  entre 63.5 a 155.0  $\mu\text{g/mL}$ . Em amastigotas de *L. chagasi*, 250  $\mu\text{g/mL}$  do veneno da *B. jararaca* causou 96% de mortalidade e o melhor valor de  $IC_{50}$  com o intervalo entre 55.6 a 90.9  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados realçam que as concentrações de 250  $\mu\text{g/mL}$  dos venenos da *C. d. terrificus* e da *B. jararaca* podem ser dados continuidade em estudos *in vivo* por apresentarem maior letalidade nos protozoários estudados revelando baixa citotóxicidade. Portanto, estudos mais aprofundados dos venenos dessas serpentes podem contribuir para novas pesquisas contra a leishmaniose visceral e doença de Chagas em humanos e animais domésticos.

**Palavras-chave:** *Crotalus*. *Bothrops*. Citotoxicidade. *Leishmania chagasi*. *Trypanosoma cruzi*.

## BSTRACT

The venoms of poisonous snakes come calling special attention of researchers for presenting active substances in the development of drugs against various diseases. Have mostly proteins and peptides that result from an ongoing evolutionary process. In Brazil, only *Viperidae* and *Elapidae* families are considered poisonous. The *Bothrops* and *Crotalus* genera derivatives of the *Viperidae* family have a wide variety of compounds which are already used in medical treatment. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of venom total of *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* in promastigotes and amastigotes *Leishmania chagasi*, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. These venoms were tested at various concentrations. To determine the inhibitory concentration 50% of parasites (IC<sub>50</sub>) the MTT test was performed on promastigotes RAW 264.7 and LLC - MK2 cells of *L. chagasi* and trypomastigotes of *T. cruzi*. In amastigotes of *L. chagasi* and *T. cruzi* an ELISA assay was performed *in situ*. The venoms in the concentration of 500 mg/mL showed 100% lethality on the cells studied. Have a concentration of 250 mg/mL obtained less than 50% cytotoxicity. They presented high toxicity in trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi*. The best IC<sub>50</sub> trypomastigotes were 81.5 to 213.0 mg/mL and 77.9 to 293.8 mg/mL in amastigotes of *T. cruzi* obtained by venom of *C. d. terrificus*. In promastigotes, the venom of *C. d. terrificus* caused 71.1% mortality at a concentration of 250 mg/mL and IC<sub>50</sub> from 63.5 to 155.0 mg/mL. In amastigotes of *L. chagasi*, 250 mg/mL of the venom of *B. jararaca* caused 96% mortality and the best IC<sub>50</sub> value with the range of 55.6 to 90.9 mg/mL. The results highlight the concentration of 250 mg/mL of the venom *C. d. terrificus* and *B. jararaca* continuity can be given for *in vivo* studies show higher mortality in protozoa studied revealing low cytotoxicity. Therefore, further studies of the venoms of these snakes can contribute to new research against visceral leishmaniasis and Chagas disease in humans and domestic animals.

**Keywords:** *Crotalus*. *Bothrops*. Cytotoxicity. *Leishmania chagasi*. *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Chocalho na ponta da cauda da serpente <i>Crotalus durissus</i> (cascavel)                                                        | 19 |
| Figura 2 - Imagem mostrando a localização da fosseta loreal                                                                                  | 19 |
| Figura 3 - Serpente do gênero <i>Micrurus</i> , conhecida como cobra-coral. Única serpente peçonhenta ausente de fosseta loreal              | 19 |
| Figura 4 - Tipos de dentição das serpentes peçonhentas. Dentição proteóglifa (A) e dentição solenóglifa (B)                                  | 20 |
| Figura 5 - Serpente <i>Bothrops jararaca</i>                                                                                                 | 21 |
| Figura 6 - Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>                                                                                      | 21 |
| Figura 7 - Serpente <i>Lachesis muta</i>                                                                                                     | 22 |
| Figura 8 - Serpente <i>Micrurus lemniscatus</i>                                                                                              | 22 |
| Figura 9 - Leishmaniose tegumentar no cão (A); Leishmaniose tegumentar no homem (B)                                                          | 26 |
| Figura 10 - Leishmaniose mucocutânea no cão (A); Leishmaniose mucocutânea no homem (B)                                                       | 27 |
| Figura 11 - Leishmaniose visceral no cão (A); Leishmaniose visceral no homem (B)                                                             | 27 |
| Figura 12 - <i>Lutzomyia longipalpis</i> , vetor da leishmaniose visceral fazendo o repasto e liberando a forma promastigota no reservatório | 28 |
| Figura 13 - Protozoário do gênero <i>Leishmania</i> . Formas amastigotas (A) e formas promastigotas (B)                                      | 29 |
| Figura 14 - Ciclo biológico da leishmaniose visceral envolvendo o cão e o homem                                                              | 30 |
| Figura 15 - Triatomíneo (barbeiro) transmissor do <i>Trypanosoma cruzi</i>                                                                   | 35 |
| Figura 16 - Protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> . Forma epimastigota (A); Formas tripomastigotas (B); Formas amastigotas (C)                | 35 |
| Figura 17 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no ser humano                                                                        | 36 |

## Capítulo 1

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 - Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at 15.0% in denaturing conditions. In the first well, the molecular weight was placed (MW); in the second, the <i>C. d. cascavella</i> (CDC) venom; in the third, the <i>C. d. terrificus</i> (CDT) venom and in the fourth, the venom of <i>B. jararaca</i> (BJ) .....                                                                                            | 61 |
| Figure 2 - Percentage of survival of RAW 264.7 cells in different concentrations of the venoms tested using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the <i>C. d. cascavella</i> venom on RAW 264.7 cells. (b) Effect of the <i>C. d. terrificus</i> venom on RAW 264.7 cells. (c) Effect of the <i>B. jararaca</i> venom on RAW 264.7 cells .....                                                          | 62 |
| Figure 3 - Percentage of survival of LLC-MK2 cells in different venom concentrations using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of <i>C. d. cascavella</i> venom on LLC-MK2 cells. (b) Effect of <i>C. d. terrificus</i> venom on LLC-MK2 cells. (c) Effect of <i>B. jararaca</i> venom on LLC-MK2 cells .....                                                                                             | 63 |
| Figure 4 - Percentage of survival of <i>L. chagasi</i> promastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the <i>C. d. cascavella</i> venom in <i>L. chagasi</i> promastigotes. (b) Effect of the <i>C. d. terrificus</i> venom in <i>L. chagasi</i> promastigotes. (c) Effect of the <i>B. jararaca</i> venom in <i>L. chagasi</i> promastigotes ..... | 64 |
| Figure 5 - Percentage of survival of <i>T. cruzi</i> trypomastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the <i>C. d. cascavella</i> venom in <i>T. cruzi</i> trypomastigotes. (b) Effect of the <i>C. d. terrificus</i> venom in <i>T. cruzi</i> trypomastigotes. (c) Effect of the <i>B. jararaca</i> venom in <i>T. cruzi</i> trypomastigotes ..... | 65 |
| Figure 6 - Percentage of survival of <i>L. chagasi</i> amastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the <i>C. d. cascavella</i> venom in <i>L. chagasi</i> amastigotes. (b) Effect of the <i>C. d. terrificus</i> venom in <i>L. chagasi</i>                                                                                                        |    |

amastigotes. (c) Effect of the *B. jararaca* venom in *L. chagasi* amastigotes..... 66

Figure 7 - Percentage of survival of *T. cruzi* amastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the *C. d. cascavella* venom in *T. cruzi* amastigotes. (b) Effect of the *C. d. terrificus* venom in *T. cruzi* amastigotes (c) Effect of the *B. jararaca* venom in *T. cruzi* amastigotes..... 67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Microgramas

µL – Microlitros

µm – Micrômetro

ATV – Solução de Tripsina Versene

CBB – Brilliant Blue G250

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

CPD – Citrato Fosfato Dextrose

DC – Doença de Chagas

DMSO – Dimetil Sulfóxido

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FCS – Fetal Calf Serum

FLA2 – Fosfolipase A2

H<sub>2</sub>O – Água

HCl – Hydrochloric Acid

IC<sub>50</sub> – Concentration of drug able to inhibit 50% of parasites

ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva

IgG – Imunoglobulina G

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares

kDa – Quilodalton

LMC – Leishmaniose muco-cutânea

LT – Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

M199 – Meio de cultura celular 199

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

min. – Minuto

mL – Mililitros

MS – Ministério da Saúde

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

Nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – Chromogen Ortho-phenyldiamine

PBS – Phosphate Puffered Saline

rpm – Rotação por minuto

RPMI 1640 – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute Média

SDS – Duodecil Sulfato de Sódio

spp. – Várias espécies

UECE – Universidade Estadual do Ceará

UV – Ultravioleta

VL – Visceral leishmaniasis

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                                                                                                                                     | 15 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                                                                                                                                                                                          | 18 |
| 2.1 AS SERPENTES E SUAS PEÇONHAS .....                                                                                                                                                                                                        | 18 |
| 2.1.1 Componentes dos venenos das serpentes dos Gêneros <i>Crotalus</i><br>e <i>Bothrops</i> .....                                                                                                                                            | 22 |
| 2.1.2 Importância de estudar o veneno de serpentes .....                                                                                                                                                                                      | 25 |
| 2.2 LEISHMANIOSES .....                                                                                                                                                                                                                       | 26 |
| 2.2.1 Leishmaniose visceral .....                                                                                                                                                                                                             | 27 |
| 2.2.1.1 Etiologia e infecção .....                                                                                                                                                                                                            | 28 |
| 2.2.1.2 Sintomas no cão e no homem .....                                                                                                                                                                                                      | 30 |
| 2.2.1.3 Tratamento no cão e no homem .....                                                                                                                                                                                                    | 32 |
| 2.3 TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA .....                                                                                                                                                                                                           | 33 |
| 2.3.1 Etiologia e infecção .....                                                                                                                                                                                                              | 34 |
| 2.3.2 Sintomas no cão e no homem .....                                                                                                                                                                                                        | 37 |
| 2.3.3 Tratamento no cão e no homem .....                                                                                                                                                                                                      | 38 |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....                                                                                                                                                                                                                  | 39 |
| <b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....                                                                                                                                                                                                            | 40 |
| <b>5 OBJETIVOS</b> .....                                                                                                                                                                                                                      | 41 |
| 5.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                                                                                                                                                                      | 41 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                                                                                                                               | 41 |
| <b>6 CAPÍTULO 1</b> - Cytotoxicity of <i>Crotalus durissus cascavella</i> , <i>Crotalus</i><br><i>durissus terrificus</i> and <i>Bothrops jararaca</i> whole venoms in <i>Leishmania</i><br><i>chagasi</i> and <i>Trypanosoma cruzi</i> ..... | 42 |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                                                                                                                                     | 68 |
| <b>8 PERSPECTIVAS</b> .....                                                                                                                                                                                                                   | 69 |
| <b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                                                                                                                                                                     | 70 |

## 1 INTRODUÇÃO

Acidentes por ataques de serpentes peçonhentas constituem um grande risco aos animais domésticos e ao homem em muitas regiões do mundo (NADUR-ANDRADE et al., 2012). Nas serpentes, a produção de veneno é uma adaptação evolutiva com a função principal de imobilizar suas presas e auxiliar na digestão. Secundariamente a esta função, o veneno também é utilizado na auto-defesa (MURARI et al., 2005). Eles possuem misturas complexas de toxinas e enzimas que mostram diferentes atividades nos diversos sistemas biológicos, tais como: citotóxica, hemorrágica, liberação de bradicinina, trombina-like, hemólise, efeitos cardiovasculares e hipotensores, necrose do tecido e efeitos neurotóxicos (PATIÑO, et al., 2013).

Analisando-se os animais peçonhentos, as serpentes possuem as substâncias mais complexas, pois contêm vinte ou mais componentes diferentes em seus venenos, sendo mais de 90% de seu peso seco constituído por enzimas, toxinas não enzimáticas, proteínas e proteínas não tóxicas. As frações não protéicas são representadas por carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). Por possuírem um verdadeiro coquetel de substâncias farmacológicas, são consideradas uma verdadeira “farmácia viva”. Seus venenos vêm sendo utilizados por inúmeros pesquisadores para o desenvolvimento de novos fármacos com potente ação contra microorganismos (MAINERI, 2012).

O Brasil apresenta diversas famílias de serpentes. Dentre elas, somente duas abrangem as serpentes consideradas peçonhentas: a família *Viperidae*, destacando-se a subfamília *Crotalinae*, à qual pertencem os gêneros *Crotalus* (Cascavel), *Bothrops* (Jararaca) e *Lachesis* (Surucucu); e a família *Elapidae*, que engloba o gênero *Micrurus* (Corais verdadeiras) (MELGAREJO, 2003).

Os venenos das serpentes da família *Viperidae*, contêm um grande número de proteínas farmacológica e bioquimicamente ativas, além de serem mais complexos que os pertencentes a de outras famílias (DAL PAI e SANTO NETO, 1994). As análises bioquímicas dos venenos das serpentes são úteis no auxílio ao diagnóstico, no acompanhamento clínico e no prognóstico de diversas moléstias que acometem os animais (SILVA et al., 2010).

Existem vários motivos para estudar e pesquisar venenos de serpentes. Os principais são: isolamento de uma ou mais substâncias ativas no veneno que em baixas

concentrações podem apresentar efeitos farmacológicos de grande interesse para a pesquisa de medicamentos; melhor compreensão da função das substâncias isoladas do veneno de serpentes no envenenamento e verificar se existe algum princípio ativo, sintético ou natural que possa inibir a ação do veneno e de algumas proteínas isoladas do mesmo (TICLI, 2006).

A enzima L-amino oxydase extraída do veneno da *Bothrops jararacussu*, apresentou ação antitumoral, bactericida e antiparasitária. Em relação sua atividade antiparasitária, atuou como leishmanicida em todas as espécies de leishmanias estudadas, com principal ação sobre a espécie *Leishmania braziliensis* onde a menor concentração apresentou lise de aproximadamente 80% dos parasitas (TICLI, 2006).

O veneno total da espécie *B. leucurus*, extraído por Torres et al. (2010), inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, além de obter baixa toxicidade contra macrófagos. No entanto, sua enzima L-amino oxydase não inibiu o crescimento destes microrganismos e também não se mostrou tóxica para macrófagos.

O veneno bruto de *Crotalus durissus collilineata* apresentou alta toxicidade sobre células mononucleares de sangue periférico humano. A sua citotoxicidade varia de forma proporcional à concentração, onde 0,0005µg/mL do veneno bruto apresentou uma baixa atividade citotóxica (MAINERI, 2012).

Passero et al. (2007) realizaram experimentos comparativos da atividade anti-*Leishmania* do veneno de três *Crotalus durissus* ssp. sobre a espécie *L. amazonensis*, causadora da leishmaniose tegumentar. Como resultado, obteve que o veneno da *C. d. terrificus* possui maior atividade anti-*Leishmania* em relação a *C. d. cascavella* e a *C. d. collilineatus*, demonstrando ainda que possuía três frações principais com atividade anti-*Leishmania*. A serpente *C. d. collilineatus* apresentou menor atividade em relação as demais espécies estudadas.

O veneno da *Crotalus viridis viridis* mostrou eficácia contra todas as formas do *T. cruzi*. O parasita apresentou, após o tratamento com o veneno, uma redução de 76 a 93% no número de amastigotas por célula infectada. Com 96 horas de infecção, essa porcentagem aumentou para 94 a 97.4% a redução do número de parasitas intracelulares. Formas tripomastigotas também tratadas com o veneno da *C. v. viridis* tornaram-se incapazes de iniciar um novo ciclo de infecção (ADADE et al., 2011).

Os venenos das serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* possuem uma grande variedade de compostos que já são usados em vários tratamentos médicos. Alguns estudos relataram com sucesso o uso dos venenos bruto de serpentes bem como dos seus compostos purificados contra protozoários causadores de doenças em humanos e em animais domésticos. O tratamento terapêutico das leishmanioses e da doença de Chagas é baseado em medicamentos que possuem efeitos tóxicos e eficácia limitada. Por conseguinte, é necessário desenvolver novos agentes quimioterapêuticos no combate as *Leishmania* spp. e o *Trypanosoma cruzi*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AS SERPENTES E SUAS PEÇONHAS

As serpentes ou ofídios são animais vertebrados, carnívoros, ectotérmicos e pertencem ao grupo dos répteis. (INSTITUTO BUTANTAN, 2013). Elas estão agrupadas dentro da subordem *Serpentes* e ordem *Squamata*, sendo o grupo de réptil mais numeroso e mais estudado (Classe: *Reptilia*; subclasse: *Diapsida*; infraclasse: *Lepidosauria*). São encontradas em quase todo o mundo, mas habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais em razão de sua dependência do calor externo para efetuar a termorregulação. Já foram descritas aproximadamente 2.300 espécies de serpentes (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

A produção de substâncias tóxicas dos animais se dá por meio da bioacumulação de toxinas nos tecido através da alimentação ou pela produção própria por meio das glândulas produtoras de toxinas. Quando essa mistura é usada com a presença de aparato inoculador passa a ser chamada de peçonha e na sua ausência é chamada de veneno (OLIVEIRA e PIRES JR., 2011).

As serpentes que conseguem inocular seu veneno no corpo de uma presa ou vítima são classificadas como peçonhentas e aquelas que não possuem essa habilidade são chamadas de não peçonhentas. No Brasil podemos encontrar ambas as categorias inclusive em ambientes urbanos (INSTITUTO BUTANTAN, 2013).

Alguns critérios básicos são usados para identificar uma serpente peçonhenta. Elas podem possuir chocalho na ponta da cauda (Figura 1), a presença de um orifício entre os olhos e a narina denominado de fosseta loreal (Figura 2), onde a única exceção é a cobra-coral (*Micrurus*) (Figura 3) que chama atenção pela sua coloração, e a dentição de duas formas distintas. No primeiro tipo de dentição, os dentes inoculadores de venenos são pequenos e semicanaliculados chamados de dentição proteróglifa (Figura 4A). No segundo tipo, dentição solenóglifa, os dentes que injetam o veneno são longos, completamente canaliculados e curvos para trás movimentando-se para frente no momento do bote (Figura 4B) (INSTITUTO BUTANTAN, 2013).

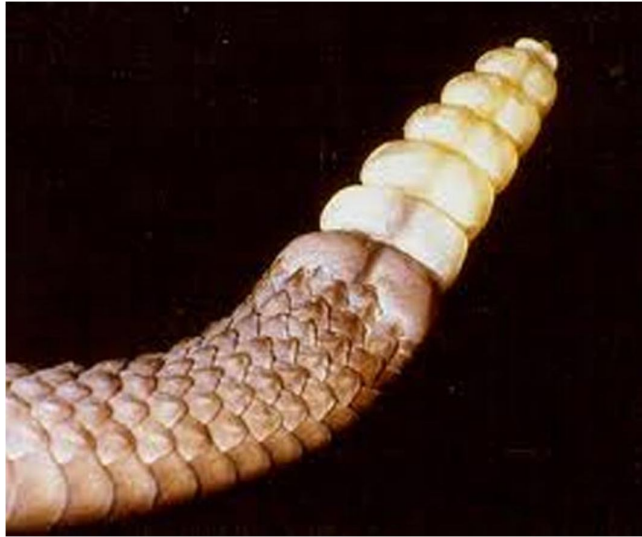


Figura 1 - Chocalho na ponta da cauda da serpente *Crotalus durissus* (cascavel). Fonte: <http://www.nosso-diaonline.com.br/?id=159-3793>.



Figura 2 - Imagem mostrando a localização da fosseta loreal. Fonte: <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/6594>.



Figura 3 - Serpente do gênero *Micrurus*, conhecida como cobra-coral. Única serpente peçonhenta ausente de fosseta loreal. Fonte: <http://www.brasilecola.com/biologia/serpentes.htm>.

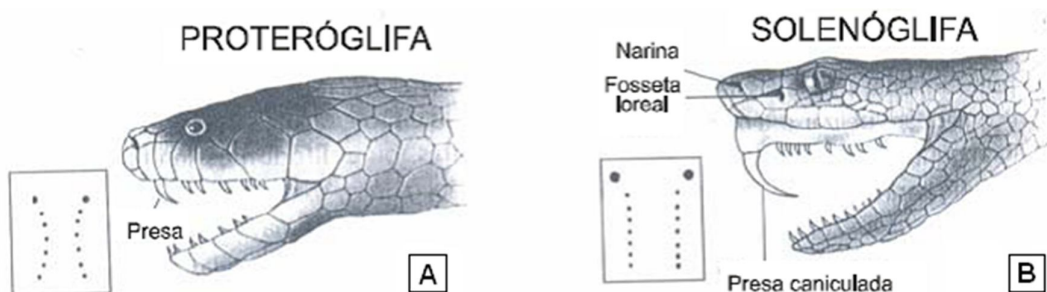


Figura 4 - Tipos de dentição das serpentes peçonhentas. Dentição proteóglifa (A) e dentição solenóglifa (B). Fonte: <http://petsebichosbr.blogspot.com.br/2013/01/exoticas-e-poderosas-assim-sao-as-cobras.html>.

As peçonhas das serpentes apresentam uma mistura complexa de toxinas que causam modificações fisiológicas nas presas e foram desenvolvidas evolutivamente como estratégia de imobilizar e capturar seu alimento, ajudando na pré-digestão do seu alimento. Os acidentes ofídicos de um modo geral ocorrem nas zonas rurais quando as serpentes estão à procura de suas presas para se alimentarem. As vítimas são geralmente homens que trabalham em plantações (SINITOX, 2013).

O potencial biotecnológico dos animais está bem distribuído nos filos, que são amplamente representados por espécies venenosas ou peçonhentas no Brasil (OLIVEIRA e PIRES JR., 2011). O Brasil tem uma rica fauna de serpentes, composta por cerca de 265 espécies, classificadas dentro de aproximadamente 73 gêneros, reunidos em 9 famílias. Dentro dessas famílias apenas a *Viperidae* e a *Elapidae* congregam as espécies que chamamos de peçonhentas, isto é, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e em animais domésticos (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

Existem quatro gêneros de serpentes peçonhentas clinicamente relevantes no Brasil. Os gêneros *Bothrops* (Figura 5), *Crotalus* (Figura 6) e *Lachesis* (Figura 7), pertencentes à família *Viperidae* e o gênero *Micrurus* (Figura 8), pertencente à família *Elapidae*. *Bothrops* e *Crotalus* são os que apresentam mais alto grau de especialização no aparelho venenífero, portanto apresentam um complexo sistema de produção e estocagem de veneno (PINHO et al., 2008). As serpentes destes gêneros são as mais relevantes estudadas no país por serem responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil e apresentarem grande diversidade na composição dos seus venenos. As serpentes do gênero *Bothrops* causam a maior porcentagem dos acidentes ofídicos

representando cerca de 90% devido à sua vasta distribuição geográfica e comportamento agressivo quando se sente ameaçada. O gênero *Crotalus* se destaca como o segundo maior caso de ofidismo representando 8%. As serpentes deste gênero costumam viver em áreas abertas, campos, regiões secas e pedregosas (SGRINOLLI et al., 2011; FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2009).



Figura 5 - Serpente *Bothrops jararaca*. Fonte: [http://zoologia.comunidades.net/index.php?pagina=1258930390\\_10](http://zoologia.comunidades.net/index.php?pagina=1258930390_10).



Figura 6 - Serpente *Crotalus durissus terrificus*. Fonte: <http://www.sicaeonline.com/both.html>.



Figura 7 - Serpente *Lachesis muta*. Fonte: <http://www.sicaeonline.com/both.html>.



Figura 8 - Serpente *Micrurus lemniscatus*. Fonte: [http://www.ivb.rj.gov.br/galeria\\_micrurus/micrurus\\_4.html](http://www.ivb.rj.gov.br/galeria_micrurus/micrurus_4.html).

### 2.1.1 Componentes dos venenos das serpentes dos Gêneros *Crotalus* e *Bothrops*

Os venenos de serpentes possuem moléculas que compreendem cerca de 90% a 95% do seu peso seco, incluindo muitas proteínas tóxicas e não tóxicas. Os principais componentes químicos presentes no veneno do gênero *Crotalus* são as crotoxinas, crotaminas, convulxinas, e giroxinas. Já no gênero *Bothrops*, os principais componentes químicos são as metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas, miotoxinas e neurotoxinas (CUNHA e MARTINS, 2012).

A crotoxina é uma  $\beta$ -neurotoxina responsável pelo efeito neurotóxico do veneno das serpentes da espécie *Crotalus durissus* por conta de sua potente atividade de bloqueio da transmissão neuromuscular. A crotoxina é formada por duas subunidades, uma ácida, não tóxica e desprovida de ação enzimática conhecida como crotoxina A ou

crotapotina; e uma básica, tóxica com atividade enzimática, conhecida como crotoxina B ou fosfolipase A2 (PLA2) (TEIXEIRA, 2012).

A crotamina pode variar significativamente sua expressão em termos de atividade e concentração de proteína em animais originários da mesma espécie e região (LOURENÇO JR et al., 2013). Ela causa efeito miotóxico e apresenta atividade sinérgica à da crotoxina, atuando principalmente nas contrações musculares, dependentes da despolarização da membrana das células musculares estriadas esqueléticas. Esta ação provavelmente é exercida sobre os canais de sódio, pela indução do influxo de cálcio (LOMONTE et al., 2003).

A convulxina é uma proteína não-enzimática que pertence à família das lectinas do tipo C, induz a ativação e a agregação plaquetária (POLGAR et al., 1997). É a toxina responsável por apresentar um quadro clínico de perda de equilíbrio, distúrbios respiratórios e circulatórios, alterações gastrintestinais, convulsões e alterações visuais logo após sua inoculação. Hematologicamente, induz agregação plaquetária com subsequente isquemia cerebral, podendo levar a morte. Quando administrada por via intravenosa em camundongos, a convulxina provoca dentro de 20 minutos uma breve fase de apnéia, seguida de perda de equilíbrio e convulsões (VARGAFTIG et al., 1983).

A giroxina é um componente protéico tóxico não letal, com bioquímica semelhante à trombina, que age sobre o sistema nervoso central, levando à lesão labiríntica causando episódios temporários de rotação do animal ao redor do seu eixo longitudinal (ALEXANDER et al., 1988). O mecanismo pela qual a giroxina induz esta síndrome neurológica ainda não foi elucidado, porém pode ser atribuída a lesões no labirinto ou outros efeitos indiretos no sistema nervoso central, relacionados à atividade enzimática desta toxina (CAMILO et al., 2001).

As metaloproteinases compõem 50% do veneno da *B. jararaca* e são responsáveis por desencadear hemorragia local no acidente bothrópico. Diversos trabalhos têm mostrado que há uma interação específica entre as metaloproteinases e seus substratos (OLIVEIRA, 2009). A metaloproteinase das toxinas hemorrágicas atua promovendo a degradação da membrana basal dos capilares sanguíneos, permitindo o escape de sangue dos capilares, seja por extravasamento de sangue através de células endoteliais danificadas ou através do alargamento das junções entre as células endoteliais, com consequente escape de sangue (diapedese) (GONÇALVES e MARIANO, 2000; GUTIERREZ et al., 2005).

As serinoproteases são enzimas proteolíticas abundantes nos venenos de serpentes da família *Viperidae*, onde constituem aproximadamente 20% do total de proteínas (BARROS, 2010). Mais de 20 famílias de serinoproteases foram identificadas até o momento e são agrupadas segundo sua similaridade estrutural e evidências funcionais (RAWLINGS e BARRETT, 1994). Desempenham muitos papéis biológicos, principalmente na digestão, hemostasia, resposta imunomediada por IgA entre muitas outras atividades importantes. Por essa razão essas proteases têm relevância farmacêutica e biomédica como alvo de drogas relacionadas à hemostasia e ativação do sistema complemento (BARROS, 2010).

As fosfolipases fazem parte de uma família de enzimas largamente distribuídas nos organismos vivos e que catalisam a hidrólise de substratos específicos, em geral um fosfolípido. Estas enzimas estão classificadas em 4 diferentes grupos (A1, A2, C e D), de acordo com o sítio de hidrólise no substrato. Dentre as fosfolipases, a mais amplamente estudada é a do tipo A2 (PLA2) devido as suas características estruturais e diversidade de efeitos farmacológicos (CUNHA, 2010). As fosfolipases manifestam neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, hemorragia interna, dentre outras (MASUDA et al., 2005).

As desintegrinas foram descritas até o momento em cinco classes com nas suas características estruturais: desintegrinas pequenas, de tamanho médio, de tamanho grande, desintegrinas-*Like* e desintegrinas diméricas (COMINETI, 2004). São peptídeos que possuem atividade antiplaquetária e antitrombótica. Estão presentes no veneno de serpentes não só da família *Viperidae* como das famílias *Atractaspididae*, *Elapidae* e *Colubridae*. As desintegrinas interagem com as integrinas na superfície celular influenciando os processos de sinalização celular, apoptoses, hemóstase, angiogênese ou câncer, dentre outros (SUCCAR, 2012).

As miotoxinas de peçonha de serpente descritas podem ser classificadas em 3 principais grupos, constituídos por famílias de proteínas estruturalmente distintas: peptídeos miotóxicos, cardiotoxinas e fosfolipases A2 (PLA2s) miotóxicas (LEITE, 2004). As miotoxinas de várias serpentes do gênero *Bothrops* revelaram que estas desestabiliza a membrana celular causando a perda da permeabilidade seletiva para íons como o cálcio, mediadores importantes no processo de necrose muscular. A mionecrose

que se estabelece após o envenenamento botrópico resultar da ação direta de miotoxinas sobre as fibras musculares (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997).

As neurotoxinas presentes no veneno das serpentes são responsáveis pelos efeitos no sistema nervoso central. A principal ação das neurotoxinas é a capacidade de bloqueio da transmissão neural, pela ligação competitiva, com os receptores pós-sinápticos das membranas do músculo esquelético e neurônios, impedindo a transmissão neuromuscular e causando morte por asfixia, elas apresentam bloqueadores altamente potentes dos canais de potássio nos neurônios (CASTRO, 2011).

### **2.1.2 Importância de estudar o veneno de serpentes**

O estudo dos venenos de serpentes é de grande importância científica para a elucidação de diversos mecanismos fisiofarmacológicos, destacando-se a neurotransmissão na junção neuromuscular, a estrutura e a função dos receptores nicotínicos, a “cascata da coagulação”, a fibrinólise, o sistema complemento, o processo inflamatório e a atividade hemorrágica e miotóxica (LUCAS, 2009).

Um exemplo do sucesso da biotecnologia é o Captopril, um medicamento para hipertensão proveniente da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, seu princípio ativo foi descoberto e isolado por Sérgio Henrique Ferreira em 1960, embora tenha sido patenteada por pesquisadores americanos, pois nesta época não existia a lei das patentes. Este caso, além de muitos outros conhecidos, reforça a necessidade do conhecimento do potencial biotecnológico dos animais venenosos do Brasil, pois, dessa forma, novos medicamentos poderão ser desenvolvidos dentro do país, gerando lucros sem que a biodiversidade seja ameaçada (OLIVEIRA e PIRES JR., 2011).

No mercado existe um pequeno número de drogas contra microorganismos e, além disso, diversos patógenos desenvolvem mecanismos de escape à ação dessas drogas, resultando no crescimento das taxas de resistência. Foi demonstrado que biomoléculas contidas nos venenos ofídicos apresentam alto valor terapêutico contra microorganismos (RIVERO, 2010).

Venenos ofídicos contêm toxinas complexas que foram desenvolvidas e aprimoradas ao longo do tempo por esses animais. Com isso, essas toxinas dispõem de grande potencial para produção de novas drogas terapêuticas. Em serpentes essas substâncias estão sendo isoladas e muitas delas são consideradas grandes ferramentas para pesquisas farmacológicas, que podem ser usadas no tratamento para amenizar

dores, tratamento de doenças como esclerose múltipla, doenças cardiovasculares, dentre outras (LEWIS e GARCIA, 2003).

## 2.2 LEISHMANIOSES

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das cinco doenças endêmicas infecto-parasitárias de maior relevância que causa problema de saúde pública em todo o mundo e chegando a atingir aproximadamente 88 países (GUERRA et al., 2007; SILVA, 2009).

Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. É considerada uma importante doença infecciosa pela OMS pelo seu alto coeficiente de detecção, que indica o número de casos novos registrados no decorrer de um ano, e por sua capacidade de produzir deformidades no corpo do infectado (MARCOLINO, 2010).

As manifestações clínicas da doença dependem da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro, podendo ser denominadas de: leishmaniose tegumentar (LT) (Figura 9), leishmaniose mucocutânea (LMC) (Figura 10) e leishmaniose visceral (LV) (Figura 11) (SILVA, 2009). O diagnóstico precoce e o tratamento da LV são importantes para evitar danos severos que podem levar o paciente à morte (CAVALCANTI, 2008).

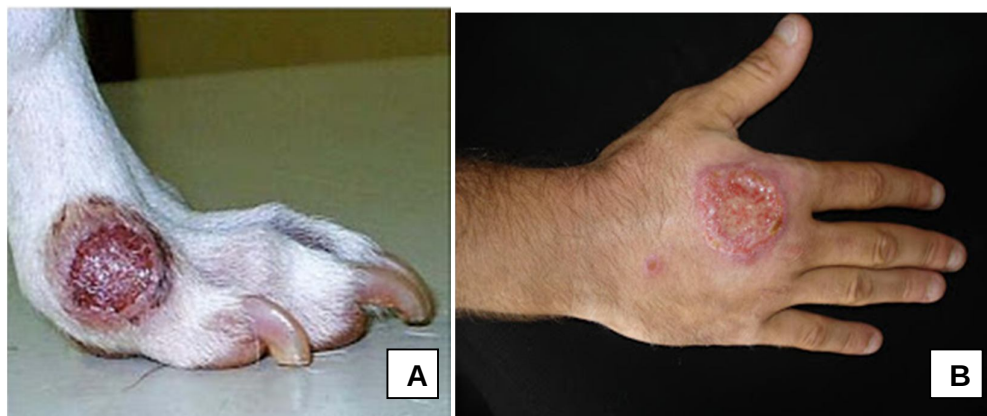


Figura 9 - Leishmaniose tegumentar no cão (A). Fonte: <http://matiassinantropicos.blogspot.com.br/2013/03/epidemiologia-aplicada-as-zoonoses.html>; Leishmaniose tegumentar no homem (B). Fonte: <http://blogconexasocial.blogspot.com.br/2012/07/doencas-tropicais-leishmaniose.html>.



Figura 10 - Leishmaniose mucocutânea no cão (A). Fonte: <http://jornalcidadeonline.blogspot.com.br/2013/06/leishmaniose-uruguaiana-registra.html>; Leishmaniose mucocutânea no homem (B). Fonte: <http://matiassinantropicos.blogspot.com.br/2013/03/epidemiologia-aplicada-as-zoonoses.html>.

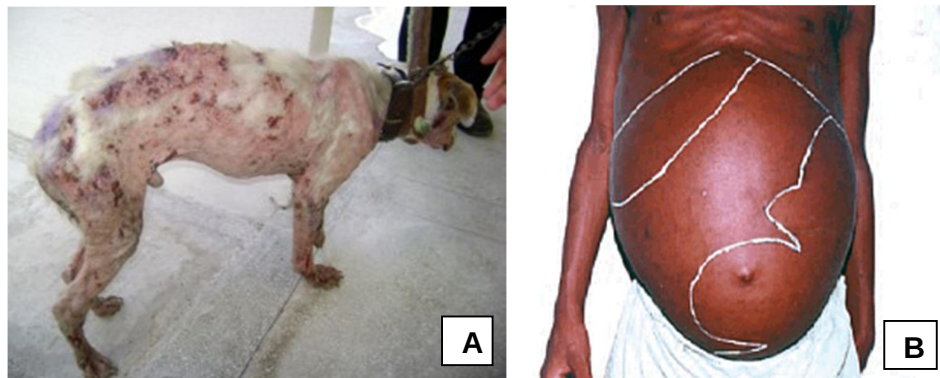


Figura 11 - Leishmaniose visceral no cão (A). Fonte: <http://jornallocal.com.br/site/destaques/saude-promove-acao-contra-leishmaniose-visceral-no-colinas-do-ermitage/>; Leishmaniose visceral no homem (B). Fonte: <http://www.brasilecola.com/doencas/leishmaniose-visceral.htm>.

### 2.2.1 Leishmaniose visceral

Atualmente a LV, ou calazar, como é popularmente conhecida, é considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (COSTA, 2011; ALVAR, 2012). Mais de 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (ALVAR, 2012). No Brasil é uma zoonose em expansão podendo ser fatal em 5 a 10% dos casos humanos, mesmo realizando o tratamento nos pacientes (PRADO et al., 2011; DUARTE et al., 2008). No início de 1980, a LV foi considerada em geral uma zoonose de caráter rural. Atualmente com o processo de desenvolvimento das grandes cidades, a doença se urbanizou já sendo encontrada nos centros urbanos das 5 regiões do Brasil (HARHAY et al., 2011).

Nos últimos dez anos, a transmissão autóctone foi registrada em mais de 1.600 municípios brasileiros, distribuídos por 19 das 27 unidades federadas, com incidência média de dois casos por 100.000 habitantes (WERNECK et al., 2008). No período de 2001 a 2006, foram notificados 20.635 casos no país: 4.526 em 2006, dos quais 52,9% (2.393) no Nordeste brasileiro (SOUZA et al., 2008).

No Brasil, sua importância não está relacionada somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (GONTIJO e MELO, 2004).

#### 2.2.1.1 Etiologia e infecção

A LV é uma doença causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* que possui três espécies pertencentes ao complexo donovani responsáveis pela doença. São elas: *L. donovani* na Ásia e na África; *L. infantum* na Ásia, Europa e África e *L. chagasi* nas Américas. O principal agente etiológico no Brasil é a *Leishmania chagasi* e a principal espécie transmissora é a fêmea de dípteros da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, o *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Figura 12). A doença pode acometer homens, canídeos e marsupiais (SUNDAR et al., 2002; LAINSON e RANGEL, 2005; CAMARGO et al., 2007).



Figura 12 - *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral fazendo o repasto e liberando a forma promastigota no reservatório. Fonte: <httppt.wikipedia.orgwikimosquito-palha.jpg>.

Os parasitas apresentam três formas diferentes no ciclo biológico, a amastigota (Figura 13A), a promastigota (Figura 13B) e a paramastigota. A forma amastigota tem característica ovóide ou esférica, uninucleada, com cinetoplasto em forma de bastão e ausência de flagelo. A forma promastigota possui formato alongado e pequeno, uninucleada, flagelada e possui cinetoplasto ovóide localizado na região anterior, enquanto a forma paramastigota possui formato achatado, sendo também flagelada, uninucleada e com cinetoplasto próximo ao núcleo (PEREIRA, 2013).

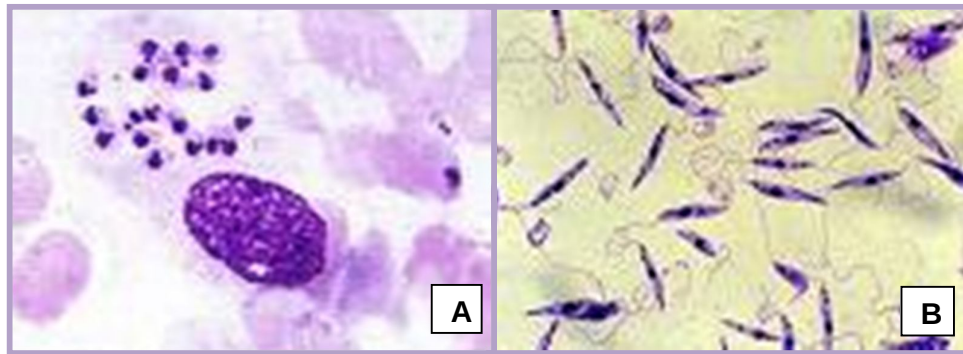


Figura 13 - Protozoário do gênero *Leishmania*. Formas amastigotas (A) e formas promastigotas (B).  
Fonte: <http://enfermagem-sae.blogspot.com/2009/04/leishmaniose-visceral-ou-calazar.html>.

O ciclo da doença começa quando o *Lutzomia. longipalpis* infecta-se com formas amastigotas da *L. chagasi* após o repasto sanguíneo através de um reservatório contaminado, podendo ser mais comumente o cão ou o homem nos centros urbanos. Desta maneira ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas. No trato digestório do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas. Essas formas se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas, que também se reproduzem rapidamente por divisão binária. As promastigotas se transformam em paramastigotas onde coloniza o esôfago e a faringe do vetor permanecendo aderidas ao epitélio do flagelo, se diferenciando em formas infectantes promastigotas metacíclicas (MORDASKI et al., 2009).

Quando o vetor infectado se alimenta de um hospedeiro vertebrado, acaba liberando a forma promastigota metacíclica juntamente com sua saliva. No hospedeiro esta forma é fagocitada por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento da membrana celular, ocorrendo à liberação desta forma que será fagocitada por novos

macrófagos num processo contínuo (Figura 14). A disseminação dos parasitas ocorre por via sanguínea para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MORDASKI et al., 2009).

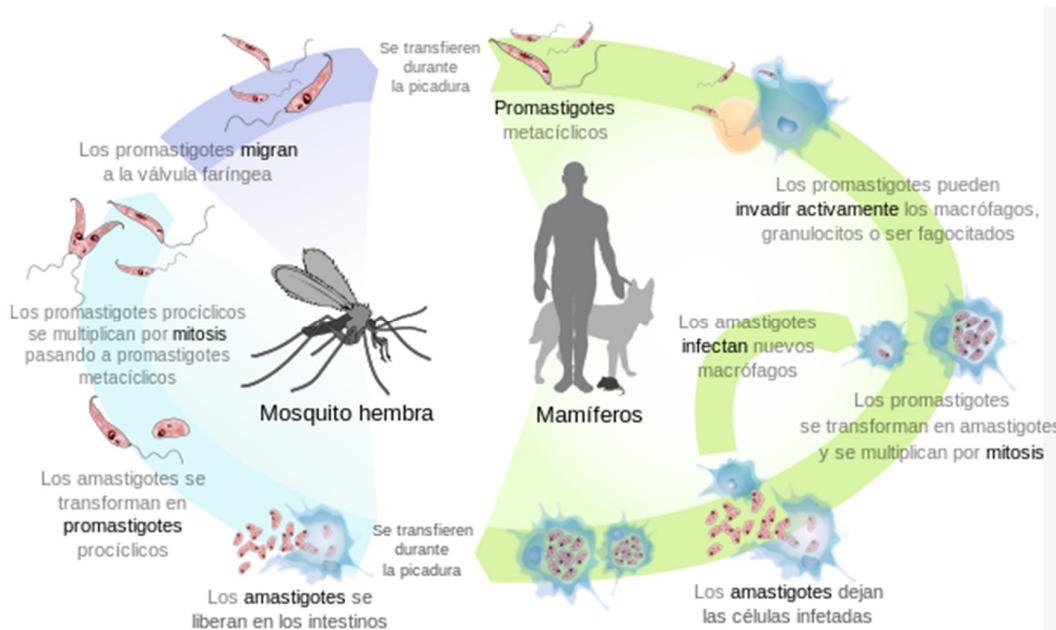


Figura 14 - Ciclo biológico da leishmaniose visceral envolvendo o cão e o homem. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Leishmaniose>.

A infecção pode ocorrer também através da transmissão iatrogênica pela transfusão de sangue contaminado (SHERDING, 2006). Outras formas de transmissão como a via transplacentária e a venérea já foram relatadas (BOGGIATTO et al, 2011; NAUCKE, 2012).

#### 2.2.1.2 Sintomas no cão e no homem

A LV pode ser fatal se não tratada, pois o hospedeiro não consegue desenvolver uma resposta protetora eficiente contra o parasita (SILVA, 2007). Os sintomas clínicos da doença no cão e no homem são similares e apresentam sinais inespecíficos. No cão, a incidência da doença ocorre quatro vezes mais frequente do que no homem. De um modo geral, os principais órgãos acometidos pela LV são: baço, fígado, tecido hemocitopoético, pulmões e rins (SILVA, 2009; GARCIA et al., 2009).

Em cães infectados a manifestação dos sintomas depende da imunocompetência do animal, podendo apresentar formas sintomáticas, oligossintomáticas e assintomáticas (GARCIA et al., 2009). A infecção assintomática pode permanecer por um longo

período até o animal apresentar-se imunossuprimido e manifestar a doença (LEAL, 2009).

A evolução da doença no cão ocorre de forma lenta e insidiosa. Inicialmente os parasitas se encontram no local da picada e se espalham pela derme. Posteriormente, atingem a circulação sanguínea afetando principalmente baço, gânglios linfáticos, fígado, medula óssea e rins. Os animais sintomáticos, no início da manifestação da doença, podem apresentar lesões cutâneas nas regiões da orelha, espelho nasal, boca e ao redor dos olhos, úlceras rasas, pêlos opacos e onicogrifose. Na forma mais avançada da doença observa-se a presença de esplenomegalia, linfadenopatia, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hematoquesia, edema de patas, vômitos e hiperqueratose. Na fase final da enfermidade também podem ocorrer paresia das patas posteriores, caquexia, inanição, anorexia e morte (ASSIS, 2010).

Sinais clínicos atípicos atualmente também vêm sendo relatados. A doença está afetando diversos sistemas como cardiovascular, respiratório, digestório, músculo-esquelético e nervoso. Podendo causar lesões na língua, diarreia, osteomielite, artrite, infertilidade e aborto (TURCHETTI et al., 2013). Em alguns animais acometidos foram relatadas lesões genitais, o que leva a pensar na possibilidade de transmissão venérea da LV (ROCHA, 2012).

No homem a esplenomegalia, a hepatomegalia e a micropoliadenia são notáveis nos achados clínicos. A doença gera febre recorrente com picos diários que persistem durante toda a infecção. Alterações hepáticas associadas a fatores vasculares podem levar ao surgimento de edema nos membros inferiores. Podem ocorrer também alterações pulmonares induzindo tosses em 72% e 81% dos pacientes. Já nos rins, podem ocorrer quadros de glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial, causando desconforto e dor urinária (NEVES et al., 2012; REY, 2011; COSTA et al., 2010).

A doença crônica é marcada pelo progressivo emagrecimento e enfraquecimento geral, aumentando a suscetibilidade às infecções secundárias. Em alguns casos a evolução pode ser rápida, levando o paciente à caquexia e à morte dentro de algumas semanas ou poucos meses. Embora as alterações provocadas pelo parasita possam, por si só, determinar a morte dos pacientes, frequentemente, ela é atribuída a infecções secundárias (NEVES et al., 2012; REY, 2011; OLIVEIRA et al., 2010).

### 2.2.1.3 Tratamento no cão e no homem

O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) ainda é polêmico no Brasil (SILVA, 2009). Através da Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, do Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), está proibido o tratamento de cães com a utilização de drogas da terapêutica humana ou drogas não registradas no MAPA (BRASIL, 2013).

Alguns estudos corroboram com o MS relatando que o tratamento de animais em alguns países vem acarretando no surgimento e disseminação de cepas resistentes do parasita. Comunidades nas quais o tratamento em cães é praticado têm sido alertadas com o argumento de que o tratamento pode gerar consequências imprevisíveis e danos irreversíveis (BRASIL, 2009).

Apesar de não existir até o momento a cura parasitológica, como também acontece com outras doenças causadas por protozoários, alguns médicos veterinários defendem o tratamento por conseguirem remissão dos sinais clínicos, manutenção da qualidade de vida do animal e diminuição da carga parasitária. Com esses benefícios consequentemente o tratamento causa a diminuição ou supressão da capacidade de transmissão da doença pelo cão (WSPA, 2011).

Em países onde o tratamento em cães é permitido, o protocolo é baseado no uso de antimoniais pentavalentes como o Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) e o Polisulfato de Sódio (Pentosan®). Como efeitos adversos desse tratamento, o cão pode apresentar vômito, diarreia, dor e fibrose muscular, formação de abscessos, tromboflebite e insuficiência renal. Concomitante ao antimônico pentavalente, o Alopurinol pode ser usado como fármaco de manutenção (TROY, 2009; PAPICH, 2009). Outros fármacos utilizados são a Anfotericina B, Miltefosina, pentamidina e a amonosidina (TROY, 2009). Esses medicamentos são considerados tóxicos e apresentam efeitos adversos graves no uso prolongado. O tempo e o efeito do tratamento dependem do estágio clínico da doença (PELISSARI et al., 2011).

No homem o tratamento é feito de forma gratuita pela rede de saúde pública. Quase todos os pacientes que não são tratados chegam a óbito, pois a evolução da doença compromete o sistema imunológico e o organismo não resiste a outras infecções (KILLICK-KENDRICK, 1990). Antes de se iniciar o tratamento, alguns cuidados devem ser observados: avaliação e estabilização das condições clínicas e co-morbidades

presentes no diagnóstico da leishmaniose visceral, além da realização do eletrocardiograma (ECG) (BRASIL, 2003).

Na maioria dos casos, as drogas de primeira escolha para o tratamento dos pacientes são os antimoniais pentavalentes. Eles possuem muitos efeitos adversos devido ao tratamento prolongado. Essas drogas não podem ser tomadas por mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres de gestação, devido à sua efeito abortivo. O Glucantime® é contra indicado em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores e drogas antiarrítmicas, com insuficiência renal ou hepática (BRASIL, 2004).

A anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível, atuando nas formas promastigotas e amastigotas (SILVA et al., 1997). É ainda a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contraindicações ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes, entretanto, complicações renais são as complicações mais importantes (BRASIL, 2004).

Outras drogas como a pentamidina, o miltefosine e a paramomicina também têm sido utilizadas como alternativas para os casos de resistência aos antimoniais pentavalentes, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas (LÓPEZ, 2010).

## 2.3 TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA

A tripanossomíase americana é mais conhecida como doença de Chagas (DC) por ter sido descoberta pelo médico e pesquisador Carlos Chagas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), também conhecido como Instituto de Manguinhos, na tentativa de combater uma epidemia de malária que ocorria no estado de Minas Gerais no ano de 1907 (MARQUES, 2013).

Chagas descreveu o agente etiológico desta doença, o vetor, bem como as manifestações clínicas das fases aguda e crônica desta enfermidade, o reservatório na natureza (animais selvagens), vários aspectos da patogenia e inferiu o seu impacto socioeconômico, causando muita polêmica na época (GARCIA, 2009). O aumento do conhecimento sobre a história natural da doença e melhor eficácia das intervenções clínicas e cirúrgicas, levou à redução da mortalidade específica e aumento da sobrevivência dos indivíduos infectados (MARTINS-MELO et al., 2012).

Atualmente a DC acomete 11 milhões de pessoas nos países pertencentes ao Mercossul como a Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (ACHÁ, 2009). Embora seja originária da América Latina, muitos casos da doença também ocorrem em outros continentes por conta da migração de indivíduos. Estima-se que por volta de 16 milhões de pessoas possam estar infectadas e cerca de 75 a 90 milhões estejam sob potencial risco de se tornarem infectadas (COURA e DIAS, 2009). Trata-se de uma zoonose majoritariamente transmitida por vetores que se manifesta em forma de microepidemia com casos graves e alta letalidade (PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2006).

A doença é manifestada em duas formas clínicas: uma aguda, que pode ou não ser identificada, podendo evoluir para uma forma crônica. No Brasil predominam os casos crônicos decorrentes de infecção por via vetorial. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada em diferentes estados, em especial na região da Amazônia Legal (BRASIL, 2010).

A DC é considerada como negligenciada nas prioridades de desenvolvimento tecnológico pelas indústrias farmacêuticas, programas assistenciais, núcleos universitários e órgãos financiadores. Ela e outras endemias presentes no Brasil são indiferentes por empresas farmacêuticas e por sedes de pesquisas internacionais (AMATO NETO e PASTERNAK, 2009).

### **2.3.1 Etiologia e infecção**

A doença de Chagas é causada por um protozoário que ganhou a designação de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz, companheiro de trabalhos de pesquisas de Carlos Chagas. O parasita é transmitido por meio das fezes de um inseto triatomíneo (Figura 21), que se alimenta exclusivamente de sangue e possui diversas denominações populares como “barbeiro”, além de outras (AMATO NETO e PASTERNAK, 2009). A doença pode acometer mais de 100 espécies mamíferas como os cães, gatos, guaxinins, gambás, tatus e em especial o homem, que se não tratada pode causar mortalidade (GOTTDENKER et al, 2012; BIGNARDE et al., 2008). O cão é considerado um importante reservatório do *T. cruzi* sendo a única espécie que apresenta manifestações clínicas da doença iguais as do homem (DANIEL NETO, 2009).



Figura 15 - Triatomíneo (barbeiro) transmissor do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: <http://forum.mundofotografico.com.br/index.php?topic=24846.0>.

O protozoário *T. cruzi* se apresenta em pelo menos três fases, morfologicamente distintas. Duas formas flageladas, a epimastigota (Figura 22A) e a tripomastigota (Figura 22B), e a forma intracelular aflagelada, chamada de amastigota (Figura 22C). As formas epimastigotas vão estar presentes no hospedeiro invertebrado e são liberadas como tripomastigotas metacíclicas nas fezes. No hospedeiro vertebrado, ocorre as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas que são as formas de desenvolvimento e intracelular, respectivamente (VIEIRA et al., 2012).

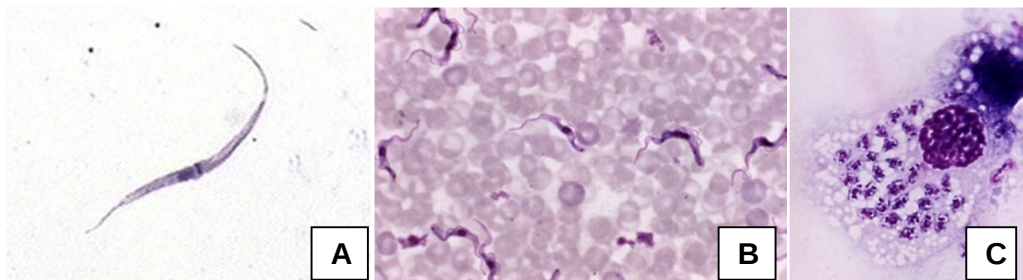


Figura 16 - Protozoário *Trypanosoma cruzi*. Forma epimastigota (A). Fonte: <http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Trypanosomacruz.html>; Formas tripomastigotas (B). Fonte: <http://www.parasitemuseum.com/trypanosome/>; Formas amastigotas (C). Fonte: <http://www.parasitemuseum.com/trypanosome/>.

A transmissão vetorial da doença se dá quando triatomídeos infectados defecam durante o repasto sanguíneo eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicas que penetram pelo orifício da picada pelo ato de coçar. As tripomastigotas metacíclicas invadem os macrófagos e se transformam em amastigotas, dividindo-se por fissão binária até que a célula do hospedeiro se rompa, liberando tripomastigotas sanguíneas na circulação. O vetor é então infectado quando ingere as tripomastigotas

durante o repasto sanguíneo. No tubo digestório do vetor ocorre a diferenciação do parasito em formas epimastigotas que posteriormente se multiplicam por divisão binária no intestino do vetor dando origem a tripomastigotas metacíclicas que vão colonizar a ampola retal do inseto triatomíneo. Quando este vetor se alimenta do sangue de um mamífero defeca sobre a pele liberando tripomastigotas. O indivíduo coça o local da picada levando as formas infectantes para o orifício recomeçando novamente o ciclo biológico do parasita (Figura 23) (NELSON e COUTO, 2006; BRASIL, 2010).

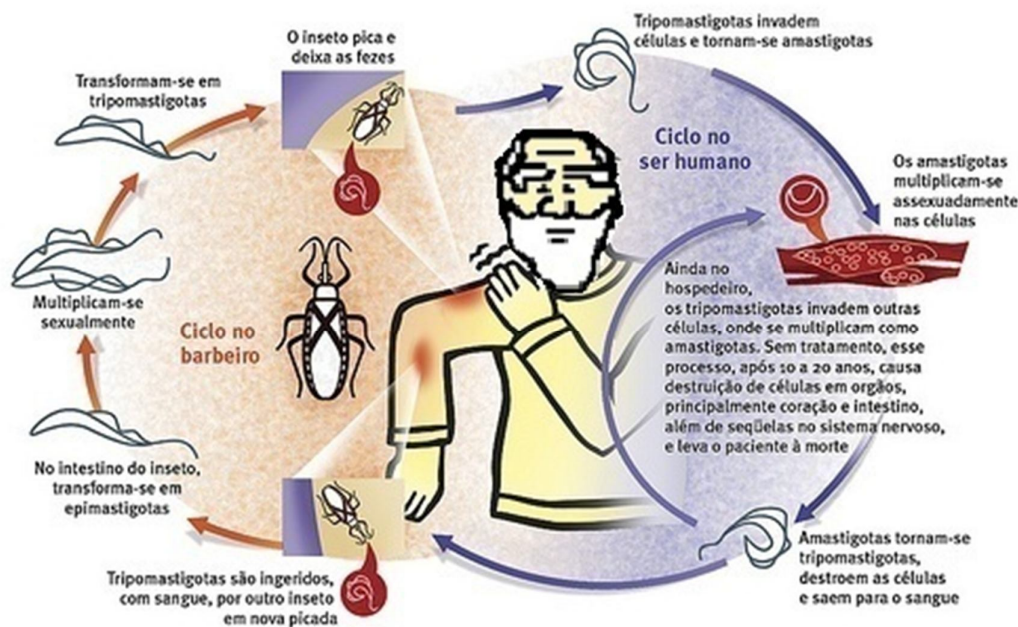


Figura 17 - Ciclo biológico do *Typanosoma cruzi* no ser humano. Fonte: <http://www.evolucaoemfoco.com.br/?p=1207>.

A transmissão por transfusão de sangue é também uma importante via de transmissão, pois formas tripomastigotas sanguíneas permanecem viáveis em produtos sanguíneos armazenadas em bancos de sangue, especialmente em áreas não endêmicas, como a Europa, onde não há controle para esta doença em bancos de sangue (VIEIRA et al., 2012; PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2006).

Pode ocorrer transmissão transplacentária e em qualquer fase da doença materna, sendo ela aguda ou crônica. A transmissão se dá em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre ou na passagem pelo canal do parto, pelo contato da mucosa do feto com o sangue da mãe infectada (PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2006;

BRASIL, 2010). A taxa de infecção congênita em recém-nascidos vivos de mães chagásicas varia de 1,6% a 10,5% e seria certamente maior se fossem considerados os abortos e os natimortos (ACHÁ, 2009).

O Brasil foi certificado em 2006 pela Organização Panamericana de Saúde como livre da transmissão vetorial. Por outro lado, a Amazônia vem apresentando aumento no número de casos agudos e crônicos. No período de 1997 a 2008, 617 casos agudos foram notificados na região. Esses surtos orais devem-se a transmissão por ingestão de sucos de frutas da região como, por exemplo, o açaí e caldo de cana contaminado com fezes de barbeiros (BARBOSA-FERREIRA et al., 2010, BRASIL, 2005).

### **2.3.2 Sintomas no cão e no homem**

A DC pode se manifestar de duas formas no cão e no homem: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda nos cães pode ser assintomática ou sintomática como na maioria das vezes. Os sintomas mais comuns são febre intermitente, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral, miocardite, meningoencefalite, apatia, anorexia, mucosas hipocoradas, edema dos quatro membros e região ventral de tórax, esplenomegalia e linfadenopatia (NELSON e COUTO, 2006; DANIEL NETO, 2009). Esta fase quase sempre é fatal em cães menores de dois anos de idade. No cão jovem a fase aguda é caracterizada por miocardite e encefalite. Na fase crônica, o animal apresenta fraqueza, intolerância a exercícios, síncope e morte súbita. A fase crônica é caracterizada pela cardiomiopatia dilatada em cães idosos (NELSON e COUTO, 2006).

No homem, a fase aguda observa-se tripomastigotas na corrente sanguínea e ninhos de amastigotas em vários órgãos, mas principalmente em células musculares (PINTO, 2006). A doença nesta fase inicial apresenta sinais e sintomas quase sempre inespecíficos, porém já foram relatados febre, dispnéia aos esforços, ortopnéia, dor torácica, anorexia, mialgia e palpitações (OLIVEIRA et al., 2010; BARBOSA-FERREIRA et al., 2010). Em crianças geralmente se inicia com um quadro febril inespecífico (LANA e TAFURI, 2005).

Na fase aguda também pode ocorrer manifestações locais quando o *T. cruzi* penetra pela conjuntiva (sinal de Romaña) ou na pele (chagoma de inoculação). Após esse período, a doença entra em uma fase crônica, que pode ou não ser determinada pela sintomatologia clínica característica da doença de Chagas (LANA e TAFURI, 2005).

A doença congênita pode causar abortamento, prematuridade, retardo de crescimento intrauterino, nati e neomortalidade. A criança pode nascer com ou sem sintomas. As manifestações clínicas observadas ao nascer ou dias após o nascimento são, por ordem de frequência: hepatoesplenomegalia, febre, anemia, icterícia, edema, cianose, manifestações hemorrágicas e neurológicas (tremores, hipertonia ou convulsões), disfagia, regurgitação e desconforto respiratório (ACHÁ, 2009).

Na fase crônica existem raros parasitas circulantes na corrente sanguínea e pode se apresentar na forma indeterminada e determinada. Na forma indeterminada, o paciente apresenta-se positivo para testes parasitológicos e/ou sorológicos, porém não apresenta sintomatologia clínica. Já na fase crônica determinada caracteriza-se pelo comprometimento cardíaco provocando cardiomegalia, miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva (ICC), patologias digestivas, megaesôfago e megacólon (OLIVEIRA et al., 2010; BRASIL, 2010).

### **2.3.3 Tratamento no cão e no homem**

A DC é pouco relatada em cães e seu tratamento também é pouco estudado. O medicamento mais eficaz relatado no tratamento da doença é o aceturato de diminazeno, que além de possuir atividade tripanocida é também considerado babesicida e bactericida. O diaceturato de diminazeno deve ser utilizado com cautela, pois pode ser tóxico, especialmente em pacientes que possuem glomerulonefrite ou hepatopatia. Outras substâncias alternativas e menos tóxicas utilizadas são a oxitetraciclina e o benzonidazol, mas possuem menor eficácia no tratamento da doença (DANIEL NETO, 2009). O Nifurtimox ((RS)-3-metil-N-[(1E)-(5-nitro-2-furil) metileno] tiomorfolin-4-amina 1,1-dióxido) utilizado no tratamento humano também é administrado, mas não encontra-se rotineiramente. A terapia para arritmias ou falha cardíaca deve ser instituída quando necessária (NELSON e COUTO, 2006).

No homem, as recomendações atuais para o tratamento da DC no Brasil embasadas pelo MS sugerem que os casos da doença adquirida através do vetor, da transmissão oral, congênita, através de acidentes de laboratório ou qualquer outra via de transmissão devem ser tratados com benznidazol ou Nifurtimox que pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ao benznidazol. Outras substâncias estão sendo testadas *in vitro* e *in vivo* na expectativa de ampliar as dogas de escolha (COURA, 2012; BRASIL, 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

Alguns estudos mostram que os venenos totais de algumas serpentes e seus compostos purificados podem gerar atividade antiparasitária com sucesso. O estudo aprofundado desses compostos ajuda no melhor entendimento das suas ações no organismo e levando a descoberta de novas finalidades terapêuticas do veneno das serpentes. A leishmaniose visceral e a doença de Chagas são causadas por protozoários que acometem tanto o homem como o cão. São consideradas zoonoses de grande preocupação médica por apresentarem resistência aos fármacos bem como os agressivos efeitos adversos as drogas disponíveis. A comprovação da atividade antiparasitária dos venenos de algumas serpentes possibilita estudos mais aprofundados dos venenos totais a fim de encontrar elementos terapêuticos para a leishmaniose visceral e a tripanossomíase americana.

#### 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os venenos brutos das serpentes *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*, possuem propriedades leishmanicida e tripanocida.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos tóxicos produzidos *in vitro* pelos venenos de serpentes brasileiras contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar perfil proteico eletroforético dos diferentes venenos totais testados.
- Avaliar a citotoxicidade dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em células RAW 264.7 e LLC-MK2.
- Avaliar e comparar a ação dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*.
- Avaliar e comparar a ação dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

## 6 CAPÍTULO 1

**Citotoxicidade dos venenos totais das serpentes *Crotalus durissus cascavella*,  
*Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* sobre *Leishmania chagasi* e  
*Trypanosoma cruzi***

(Cytotoxicity of *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* whole venoms in *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*)

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Parasitology Manuscript Draft  
Manuscript Number: VETPAR-D-13-7726 Article Type: Research Paper

**Cytotoxicity of *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and  
*Bothrops jararaca* whole venoms in *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*.**

Nathalia Santiago Cezar Rosas<sup>a</sup>, Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista<sup>a</sup>, Heitor Franco de Andrade Junior<sup>b</sup>, Patrick Jack Spencer<sup>c</sup>, Miriam Camargo Guarnieri<sup>d</sup>, Claudia Maria Leal Bevilaqua<sup>a</sup>, Camila Aparecida Carvalho<sup>b</sup>, Roselaine Pereira Alvim Cardoso<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Protozoologia/Universidade de São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Zoologia e Centro de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

\* Corresponding author at: Av. Dede Brasil, 1700, 60740-913 Fortaleza, Ceará, Brazil.  
Tel.: +55 85 31019889; +55 85 87327139; fax: +55 85 31019850. E-mail address:  
janainaserrazul@gmail.com (J.S.A.M. Evangelista); or rosasnathalia@ymail.com  
(N.S.C. Rosas).

## RESUMO

A família Trypanosomatidae possui protozoários causadores de moléstias em homens e animais domésticos como as leishmanioses e a doença de Chagas. A leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*, agente etiológico mais importante da doença no Brasil. A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Medicamentos disponíveis para seus tratamentos apresentam eficácia limitada e efeitos adversos indesejáveis. Portanto, é necessário pesquisar substâncias alternativas no tratamento dessas doenças em humanos e animais domésticos. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos *in vitro* dos venenos totais das serpentes *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em promastigotas e amastigotas de *L. chagasi*, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e analisar a citotoxicidade em células RAW 264.7 e LLC-MK2. As concentrações dos venenos testados foram de 500.00; 250.00; 125.00; 62.50; 31.25; 15.62; 7.81 e 3.90 µg/mL. Testes de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) foram realizados para determinar as IC<sub>50</sub> dos venenos estudados sobre células RAW 264.7, LLC-MK2, promastigotas de *L. chagasi* e tripomastigotas de *T. cruzi*. Contra amastigotas de *L. chagasi* e *T. cruzi* foi realizado o ELISA *in situ*. Os venenos na concentração de 500.0 µg/mL apresentaram 100.0% de letalidade sobre as células estudadas. As demais concentrações tiveram menos de 50.0% citotoxicidade. O veneno da *C. d. cascavella* apresentou em promastigotas a IC<sub>50</sub> de 180,5 a 237.9 µg/mL e em tripomastigotas de 192.6 a 267.9 µg/mL. Nas formas amastigotas de *L. chagasi* e *T. cruzi* as IC<sub>50</sub> foram entre 181.6 a 495.5 µg/mL e 126.5 a 387.3 µg/mL, respectivamente. O veneno da *C. d. terrificus* obteve valores da IC<sub>50</sub> nas formas promastigotas de 63.5 a 155.0 µg/mL e 81.5 a 213 µg/mL em tripomastigotas. As amastigotas de *L. chagasi* e *T. cruzi* tiveram IC<sub>50</sub> de 402.9 a 1253.0 µg/mL e 77.9 a 293.8 µg/mL, respectivamente. O veneno da *B. jararaca* apresentou a IC<sub>50</sub> de 103.9 a 241.9 µg/mL em promastigotas e 137.6 a 234.1 µg/mL em tripomastigotas. Nas amastigotas de *L. chagasi* e *T. cruzi* as IC<sub>50</sub> foram de 55.6 a 90.9 µg/mL e 209.2 a 496.8 µg/mL, respectivamente. Os resultados realçam que as concentrações de 250.00 e 125.00 µg/mL dos venenos da *C. d. terrificus* e da *B. jararaca* podem ser dados continuidade em estudos *in vivo* por apresentarem maior letalidade nos protozoários estudados e revelarem baixa citotóxicidade. Portanto, estudos mais aprofundados dos

venenos dessas serpentes podem contribuir para novas pesquisas contra a leishmaniose visceral e doença de Chagas.

**Palavras chave:** protozoários, venenos de serpentes, citotoxicidade.

## ABSTRACT

The family Trypanosomatidae has protozoa that cause diseases in man and domestic animals such as leishmaniasis and Chagas disease. Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania chagasi*, most important etiological agent of the disease in Brazil. Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Medicines available for the treatments of these diseases have limited efficacy and undesirable adverse effects. Therefore, it is necessary to search for alternative substances for the treatment of such diseases in humans and domestic animals. The objectives of this study were to evaluate the in vitro effects of *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* whole venoms on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* and analyze cytotoxicity in RAW 264.7 and LLC-MK2 cells. The concentrations of the venoms tested were 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90 µg/mL. MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were conducted to determine the IC<sub>50</sub> of the venoms studied on RAW 264.7 and LLC-MK2 cells, *L. chagasi* promastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes. ELISA was performed in situ on amastigotes of *L. chagasi* and *T. cruzi*. The venoms in the concentration of 500.00 µg/mL presented 100.0% lethality on the cells studied. The other concentrations were less than 50.0% cytotoxic. The venom of *C. d. cascavella* presented IC<sub>50</sub> of 180.50 to 237.90 µg/mL in promastigotes and 192.60 to 267.90 µg/mL in trypomastigotes. In amastigotes of *L. chagasi* and *T. cruzi* the IC<sub>50</sub> varied from 181.60 to 495.50 µg/mL and 126.50 to 387.30 µg/mL, respectively. The venom of *C. d. terrificus* obtained IC<sub>50</sub> values in promastigotes of 63.50 to 155.00 µg/mL and 81.50 to 213.00 µg/mL in trypomastigotes. The *L. chagasi* and *T. cruzi* amastigotes had IC<sub>50</sub> ranging from 402.90 to 1253.00 µg/mL and 77.90 to 293.80 µg/mL, respectively. The venom of *B. jararaca* presented IC<sub>50</sub> varying from 103.90 to 241.90 µg/mL in promastigotes and 137.60 to 234.10 µg/mL in trypomastigotes. In amastigotes of *L. chagasi* and *T. cruzi*, the IC<sub>50</sub> were 55.60 to 90.90 µg/mL and 209.20

to 496.80 µg/mL, respectively. The results showed that the concentrations of 250.00 and 125.00 µg/ml of the *C. d. terrificus* and *B. jararaca* venoms can be used in further in vivo studies due to their greater lethality in the protozoa studied, while presenting low cytotoxicity. Therefore, further studies of the venom compositions from these snakes can contribute to new researches against visceral leishmaniasis and Chagas disease.

**Keywords:** protozoa, snake venom, cytotoxicity.

## 1. Introduction

The Trypanosomatidae family is one of major economic and medical interest and belongs to a group of exclusively parasitic, unicellular flagellates, including many important pathogens (Aslett et al., 2009). Species from this family also possess etiological agents of diseases that are important in veterinary medicine, severely affecting animals of economic and affective interests (Wallace, 1966). These protozoa have been intensively studied because some are pathogenic for humans and domestic animals diseases, such as leishmaniasis and Chagas disease, which have a high incidence in Latin America (Motta et al., 2013). Approximately 37 million people have different forms of leishmaniasis and Chagas disease worldwide, which are caused by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*, respectively (Lopes et al., 2010). The protozoa of the genus *Leishmania* have three species that cause visceral leishmaniasis (VL). The species responsible for this disease are: *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* (Lainson; Rangel, 2005). The *L. chagasi* is the etiological agent of VL in the Central and South America, representing the most important agent of the disease in Brazil (Almeida et al., 2005). The *L. donovani* and *L. infantum* are the species that cause visceral leishmaniasis in Africa, Europe and Asia (Michalick; Genaro, 2005).

In VL, the invertebrate host is infected with amastigotes of *Leishmania* spp. after ingestion of blood containing infected macrophages. In the digestive tract of the vector that form differentiates into a form called promastigote. This form becomes paramastigota which colonizes the esophagus and pharynx of the vector differentiating into infective metacyclic promastigotes forms (Mordaski et al., 2009).

The protozoan *T. cruzi* has at least three morphologically distinct stages, changing according to their developmental stage and host (Vieira et al., 2012; Bignarde et al., 2008). In the vertebrate host the intracellular form is called amastigote. While in

the circulating blood the form found is called trypomastigote (Bignarde et al. 2008). The invertebrate host in performing the blood meal is contaminated with trypomastigotes that sequentially differentiates into the epimastigote form (Andrade; Andrews, 2005). The liberation of the protozoan in the metacyclic trypomastigote form carried by the invertebrate host occurs via defecation (Miles, 2003).

The chemotherapeutic arsenal available for the treatment of leishmaniasis and Chagas disease is restricted to a few drugs, which have limited efficacy and undesirable adverse effects (Nunes, 2008). The snake venoms, from the Viperidae family in particular, contain a large number of proteins pharmacologically and biochemically active and they are more complex than those belonging to other families (Dal Pai; Saint Neto, 1994). In the Viperidae family, subfamily Crotalinae stands out, to which belongs the *Crotalus*, *Bothrops* and *Lachesis* genera (Melgarejo, 2003). Biochemical analysis of snake venoms are useful in the diagnosis, monitoring and clinical prognosis of various diseases that affect animals (Silva et al., 2010). There are several reasons for studying and researching snake venoms. Among them, the main reason is the isolation of substances that in low concentrations may have pharmacological effects (Ticli, 2006).

With the emergence of resistance of *Leishmania* spp. and *T. cruzi* protozoa to drugs already used in human and veterinary medicine and their intense adverse effects, this study aimed to evaluate the in vitro effects of the venoms from *C. d. cascavella*, *C. d. terrificus* and *B. jararaca* snakes in promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* and to analyze the toxicity in RAW 264.7 and LLC-MK2 cells.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Ethics Committee**

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the State University of Ceará (CEUA - UECE) with the number: 12641492-0. All care has been taken to preserve the health of researchers and other professionals involved in this study and the environment in the areas where they performed the research project. These included: care instructions on safe handling of biological products and techniques to prevent accidents in laboratories and correct packaging of the material to be discarded.

## 2.2. Obtainment of the *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* venoms

The lyophilized venom from *C. d. cascavella* was kindly provided by Professor Dr. Miriam Camargo Guarnieri, Department of Zoology and Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco. The lyophilized venoms from *C. d. terrificus* and *B. jararaca* were donated by Professor Dr. Patrick Jack Spencer of the Institute of Nuclear and Energy Research at the University of São Paulo, IPEN. The venoms were diluted in phosphate buffered saline (PBS) and stored at -80°C.

## 2.3. Obtainment of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*

The promastigotes of *L. chagasi* were grown in cell culture bottles containing M199 medium (Cultilab ®) supplemented with 10.0% inactivated fetal calf serum (FCS) (Cultilab ®), sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich ®), HEPES buffer (Sigma-Aldrich ®), bovine hemin (Inlab ®), gentamicin 30.00 µg/mL (Inlab ®) and 5.0% human male sterile urine. The parasites were maintained in an incubator at 27°C. After a week of growth, the culture was examined under a light microscope to observe their viability.

Trypomastigotes of *T. cruzi* were grown in culture medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich ®) supplemented with 10.0% FCS (Cultilab ®), HEPES buffer (Sigma-Aldrich ®), 200 mM L-glutamine (Gibco ®) and 30.00 µg/mL gentamicin (Inlab ®). This culture was maintained in cell culture bottles in incubator at 27°C. After a week, the culture was analyzed in a light microscope to determine their viability.

## 2.4. Polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The protein profiles of the crude venoms of *C. d. cascavella*, *C. d. terrificus* and *B. jararaca* were evaluated by 15.0% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in denaturing conditions. The crude venoms were diluted at a concentration of 500.00 µg/mL in PBS. For this procedure, 10.00 µL of each dilution was added to the same amount of electrophoresis buffer (glycerol, 10.0% SDS, 1M Tris, pH 6.8, and bromophenol blue). The venoms were conditioned in the wells and subjected to electrophoresis using an initial voltage of 80V in the first 10 minutes, passing afterwards to 100V until the end of the assay. For the visualization of the obtained fractions, the gel was stained with 0.1% Brilliant Blue G250, 45.0% methanol

and 10.0% acetic acid (SDS-PAGE-CBB) for 20 minutes and then washed repeatedly with fixing solution (45.0% methanol and 10.0% acetic acid) to the bleaching of the polyacrylamide gel.

### 2.5. *Citotoxicity in RAW 264.7 and LLC-MK2 cells*

Cell line RAW 264.7 derived from murine monocytes were cultured in Dulbecco (Cultilab ®). The cell line LLC-MK2 originated from monkey kidney fibroblasts were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich ®). Both cell lines were counted in a Neubauer chamber, and diluted at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and plated on each 96 well plate.

### 2.6. *Leishmania chagasi promastigote test*

The promastigotes were observed under light microscope to determine their viability. They were counted in a Neubauer chamber, and diluted at a concentration of  $1 \times 10^6$  promastigotes/mL before plating in 96 well plates. The venoms were tested in the concentrations 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90  $\mu\text{g/mL}$ . The positive control was performed with 50.00  $\mu\text{g/mL}$  of pentamidine (Ítaca ®) and negative control with M199 (Cultilab ®). All compounds were tested in triplicate. Then, the plates were brought to the cell culture incubator at 27°C for 24 hours. The MTT assay followed the methodology described by Tempone (2005) and the reading was performed on an ELISA reader at 570 nm.

### 2.7. *Trypanosoma cruzi trypomastigote test*

*T. cruzi* trypomastigotes were evaluated under a light microscope to verify the viability. They were counted in a Neubauer chamber, and diluted at a concentration of  $1 \times 10^6$  trypomastigotes/mL to be plated in 96 well plates. The poisons were tested against this parasite in the concentrations of 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90  $\mu\text{g/mL}$ . The positive control was performed with 50.00  $\mu\text{g/mL}$  Pentamidine (Ítaca ®) and a negative control with RPMI 1640 (Sigma-Aldrich ®). All compounds were tested in triplicate. The plate was maintained in a cell culture incubator at 27°C for 24 hours. The MTT assay followed the methodology described by Tempone (2005) and the reading was performed on an ELISA reader at 570 nm.

### 2.8. *Leishmania chagasi* amastigotes test

Plating of RAW 264.7 cells was performed at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates, which were maintained for 24 hours in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for the adherence to occur. After the incubation period, *L. chagasi* promastigotes were added to the plate at a concentration of  $1 \times 10^6$ /well and waited infection over 24 hours in an oven at 27°C. After such period, the infection was assessed by light microscopy and the contents of the wells were aspirated leaving only the infected cells. Then, the venoms were added in the following concentrations: 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90 µg/mL. For positive control 50.00 µg/mL of pentamidine (Ítaca ®) was added and Dulbecco (Cultilab ®) was used as a negative control. All compounds were tested in triplicate. The plate was incubated for 24 hours in an incubator at 27°C. After this period, 10.0% formaldehyde was added to the wells for cell fixation and carry out the procedures of the in situ ELISA. A solution of 0.01% saponin (Merck ®) with 1.0% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich ®) diluted in 1x phosphate buffered saline (PBS) was added and incubated for 30 minutes at 37°C. Subsequently, a new solution of 5.0% skimmed milk (Nestle ®) diluted in PBS and incubated for 30 minutes at 37°C was added. The plate was washed rapidly three times in a solution of PBSLT comprising: PBS (1x), 3.0% skimmed milk (Nestle ®) and 0.05% Tween 20. After drying, in each well was added rabbit serum anti-*L. chagasi* diluted in 10.0% FCS and PBSLT. This solution was incubated overnight at a temperature of 37°C. Then, the plate was washed again three times with PBSLT slowly. The conjugated anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich ®) was diluted in PBSLT, plated, and placed in incubator at 37°C for 60 minutes. Again, three washes of the plate with PBSLT were performed and the chromogen ortho-phenyldiamine (OPD, Sigma-Aldrich ®) was added for 30 minutes in a dark chamber. Finally, the plate was added 4N hydrochloric acid (4N HCl Novaquímica ®) and read in a microplate reader using a 492 nm filter.

### 2.9. *Trypanosoma cruzi* amastigotes test

Plating of LLC-MK2 cells was performed at a concentration of  $1 \times 10^5$  cell/well in 96-well plates, which were maintained for 24 hours in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for the adherence to occur. After the incubation period, *T. cruzi* trypomastigotes were added to the plate at a concentration of  $1 \times 10^6$  trypomastigotes/well and were maintained in an incubator at 27°C for 24 hours in order to the infection to develop. After such period,

the infection was assessed by light microscopy and the contents of the wells were aspirated leaving only the infected cells. Then, the venoms were added in the following concentrations: 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90  $\mu\text{g/mL}$ . For positive control 50.00  $\mu\text{g/mL}$  Pentamidine (Ithaca  $\text{\textcircled{R}}$ ) was added and RPMI 1640 (Sigma-Aldrich  $\text{\textcircled{R}}$ ) was used as negative control. All compounds were tested in triplicate. The plate was incubated for 24 hours in incubator at 27°C. After this period, ELISA in situ was performed, as described with the *L. chagasi* amastigotes, using rabbit serum anti-*T. cruzi*. At the end of the test the plate was read on a microplate reader using a 492 nm filter.

### 2.10. Statistical analysis

IC<sub>50</sub> values (drug concentration able to inhibit 50% of parasites) in the range of 95% (confidence interval of 95%) were calculated using a nonlinear regression curve. One-way ANOVA and comparative analysis between treatments was performed by Tukey's parametric test using and 100% survival was based on the OD of the viability control containing only promastigotes or amastigotes, and/or murine monocytic cells after normalization using the statistical software GraphPad Prism 6.0.

## 3. Results

### 3.1. Polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The SDS-PAGE showed that the venoms of *C. d. cascavella* and *C. d. terrificus* have similar molecular profiles, while the venom of *B. jararaca* demonstrated to be different from the other two studied venoms.

### 3.2. Cytotoxic activity of the venoms of *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* in RAW 264.7 and LLC-MK2 cell lines

The cytotoxicity assay on RAW 264.7 cells revealed that the venoms presented cytotoxicity in 100.0% cells at the highest concentration tested (500.00  $\mu\text{g/mL}$ ). The other concentrations also showed cytotoxicity, but with a percentage below 36.0%. The venom of *C. d. cascavella* varied the values for the 50.0% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) between 236.10 to 354.60  $\mu\text{g/mL}$  for the survival rate of RAW 264.7 cells (Fig. 2a). Also, the IC<sub>50</sub> values of the *C. d. terrificus* and *B. jararaca* venoms ranged from 248.50 to 305.00 and from 247.10 to 351.40  $\mu\text{g/mL}$  (Figs. 2b and 2c), respectively.

All venoms tested demonstrated similar results in the cell line LLC-MK2 and all concentrations used in this experiment proved cytotoxic. Only the highest concentration of venoms (500.00 µg/mL) presented 100.0% mortality of the cells. The other concentrations presented below 50.0%. IC<sub>50</sub> values of the venoms of *C. d. cascavella*, *C. d. terrificus* and *B. jararaca* varied from 230.20 to 329.00, 227.70 to 341.00, and 260.90 to 366.80 µg/mL (Figs. 3a, 3b and 3c), respectively. These IC<sub>50</sub> values presented no significant differences ( $p \leq 0.05$ ) when compared to the venoms tested in the RAW 264.7 cell line.

### 3.3. Activity of the venoms in *Leishmania chagasi* promastigotes

The venom concentration of 500.00 µg/mL studied showed higher cytotoxic activity against *L. chagasi* promastigotes, followed by the concentration of 250.00 µg/mL (Fig. 4). The 500.00 µg/mL concentration was not considered ideal, since this it presented cytotoxicity of 100.0% in both RAW 264.7 and LLC-MK2 cells, proving to be highly toxic. The optimal concentration was 250.00 µg/mL, since it did not present a high cytotoxicity in the cells referred to in this work. The *C. d. terrificus* venom showed better leishmanicidal activity at this concentration, achieving 71.1% of promastigote mortality (Fig. 4b). The venoms of *C. d. cascavella* and *B. jararaca* also showed cytotoxicity at the concentration of 250.00 µg/mL and caused a mortality of 67.1 and 55.0% respectively in promastigotes (Figs. 4a and 4c). The other concentrations showed no statistically satisfactory results ( $p \leq 0.05$ ) due to the survival rate of parasites above 50.0%.

IC<sub>50</sub> values for *C. d. terrificus* were the lowest ranging from 63.50 to 155.00 µg/mL. While venoms of *C. d. cascavella* and *B. jararaca* showed higher inhibitory concentrations in *L. chagasi* promastigotes, expressing the values ranging from 180.50 to 237.90 and from 103.90 to 241.90 µg/mL, respectively. The venom of *C. d. terrificus* and *C. d. cascavella* presented different results in the parasite, although they are of the same genus. Instead, the venom *C. d. cascavella* manifested similarly to the venom of *B. jararaca*, possessing approximate IC<sub>50</sub> values, even though they belong in different genera.

### 3.4. Activity of the venoms in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes

The venoms studied showed no efficacy against *T. cruzi* trypomastigotes. The concentration that presented the greatest activity against these parasites was 500.00 µg/mL, of which the percentage of survival was 9.3% to the venom *C. d. cascavella*, 5.9% to the venom of *C. d. terrificus* and 13.4% to the venom of *B. Jararaca*, respectively (Figs. 5a, 5b and 5c). Half of this concentration (250.00 µg/mL) in the three venoms studied, was no effective against the parasites, with no significant statistical difference. The survival values of the concentration 250.00 µg/mL of trypomastigotes were approximated, representing 44.1% for the *C. d. cascavella* venom, 45.4% for the *C. d. terrificus* venom and 43.7% for the *B. Jararaca* venom, respectively (Figs. 5a, 5b and 5c). The other concentrations (125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90 µg/mL) presented mortalities below 30.0%.

IC<sub>50</sub> values also showed no significant differences when comparing the three venoms studied. The IC<sub>50</sub> values obtained from the venom of *C. d. cascavella* on *T. cruzi* trypomastigotes varied from 192.60 to 267.90 µg/mL, from 81.50 to 213.00 µg/mL of the *C. d. terrificus* venom and from 137.60 to 234.10 µg/mL of the *B. jararaca* venom.

### 3.5. Activity of the venoms in *Leishmania chagasi* amastigotes

The results obtained by ELISA in situ showed that the highest concentration studied (500.00 µg/mL), caused the highest leishmanicidal activity against *L. chagasi* amastigotes. The venom of *B. jararaca* caused the highest mortality rate of 99.5% (Fig. 6c). Secondly, the venom *C. d. cascavella* caused 85.9% mortality in *L. chagasi* amastigotes (Fig. 6a). Finally, the venom of *C. d. terrificus* caused a 31.9% of mortality in the parasites (Fig. 6b). At the concentration of 250.00 µg/mL, again the *B. jararaca* venom expressed a good mortality rate of 96.0% (Fig. 6c). While the venoms of *C. d. cascavella* and *C. d. terrificus* obtained 11.8 and 15.7% mortality, respectively (Fig. 6a and 6b). At the concentration of 125.00 µg/mL only *B. jararaca* venom presented a valid mortality of 60.7% in the parasites (Fig. 6c). The other concentrations (62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90 µg/mL) presented mortalities below 40.0%.

IC<sub>50</sub> values of the venoms studied showed significant differences between them. The IC<sub>50</sub> values obtained from the venom of *B. jararaca* showed the lowest of the analyzed venoms, ranging between 55.60 and 90.90 µg/mL. The venom of *C. d.*

*cascavella* followed with the  $IC_{50}$  values varying from 181.60 to 495.50  $\mu\text{g/mL}$ . But the venom of *C. d. terrificus* did not present  $IC_{50}$  statistically favorable, with values ranging from 402.90 to 1253.00  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.6. Activity of the venoms in *Trypanosoma cruzi* amastigotes

The ELISA in situ performed with *T. cruzi* amastigotes revealed that the venom concentration of 500.00  $\mu\text{g/mL}$  studied showed greater trypanocidal activity. The venom of *B. jararaca* presented the highest mortality rate of 90.4%, while the venom of *C. d. cascavella* had the second highest mortality rate of *T. cruzi* amastigotes with 72.5%, and the venom of *C. d. terrificus* showed the lowest mortality rate of 57.7% (Figs 7a, 7b and 7c). The other concentrations (250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.90  $\mu\text{g/mL}$ ) had no statistically satisfactory trypanocidal activity, with a survival of *T. cruzi* amastigotes of 56.7% (Figs 7a, 7b and 7c).

The  $IC_{50}$  of venom *C. d. terrificus* presented the best results among the venoms studied, ranging between the values of 77.90 and 293.80  $\mu\text{g/mL}$ . The venom of *C. d. cascavella* followed with values varying from 126.50 to 387.30  $\mu\text{g/mL}$  and the venom of *B. jararaca* with values between 209.20 and 496.80  $\mu\text{g/mL}$ .

## 4. Discussion

The electrophoresis demonstrated that the venoms of *C. d. cascavella* and *C. d. terrificus* showed similar molecular profiles with four bands of the same level. These two species differed from the venom of *B. jararaca*, which, by the analysis of the position of the bands on the gel has shown to be a poison of another different species. Although *C. d. cascavella* and *C. d. terrificus* showed bands of different molecular weights when compared to *B. jararaca*, they presented a band in common in the region close to the molecular weight of 35 kDa.

The cell lines RAW 264.7 and LLC-MK2 did not survive at the highest concentration of venoms studied (500.00  $\mu\text{g/mL}$ ). Therefore this concentration can be discarded for future in vivo tests. From the concentration of 250.00  $\mu\text{g/mL}$  *C. d. terrificus*, *C. d. Cascavella* and *B. jararaca* venoms, the survivability of these cells increased and the line RAW 264.7 showed better results than the LLC-MK2 cells. Lourenço (2000) in his studies performed with the crude venom of *B. jararaca* on LLC-MK2 cells achieved an  $IC_{50}$  of 0.82  $\mu\text{g/mL}$  while in this study we obtained a higher  $IC_{50}$

values ranging from 260.90 to 366.80 µg/mL. The two strains studied are different derivations. RAW 264.7 cells are derived from murine monocytes (Tempone et al. 2005), while the LLC-MK2 cells are fibroblasts from the epithelium of monkey kidney (Roy et al. 2012).

In this study, the IC<sub>50</sub> values for *C. d. terrificus* were the lowest ranging from 63.50 to 155.00 µg/mL. While venoms of *C. d. cascavella* and *B. jararaca* showed higher inhibitory concentrations in *L. chagasi* promastigotes expressing the values varying from 180.50 to 237.90 and 103.90 to 241.90 µg/mL, respectively. Other studies have been conducted with the venoms of *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* and *C. d. collilineatus* on *L. amazonensis* promastigotes. The results showed a higher leishmanicidal activity of *C. d. terrificus* with IC<sub>50</sub> ranging from 4.70 to 1.72 µg/mL, while *C. d. cascavella* presented IC<sub>50</sub> varying from 9.41 to 1.21 µg/mL. The venom of *C. d. collilineatus* showed a low leishmanicidal activity at higher concentrations. The IC<sub>50</sub> varied from 9.50 to 281.00 µg/mL and also increased the numbers of parasites in 50.0% at the IC<sub>50</sub> of 44.30 to 2.18 µg/mL (Passero et al. 2007). These results differ from that obtained in this study with *L. chagasi* promastigotes. This fact can be explained by the fact that these species of *Leishmania* are biologically distinct, involving different clinical presentations, since all species of *Leishmania* spp. exhibit considerable differences among themselves under different aspects (Camargo; Barcinski, 2003).

Snake venoms can be sources of new bioactive molecules with potential effects on the growth of *T. cruzi* and *Leishmania* spp. Changes in the structure and growth of *T. cruzi* epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes and *L. major* promastigotes were analyzed after treatment with crude venom of *B. jararaca*. No growth of promastigotes and epimastigotes occurred at a venom concentration of 100.00 µg/mL, whereas the IC<sub>50</sub> was obtained in concentrations of 0.10 to 0.30 µg/mL. Structural observation performed in the bloodstream trypomastigotes, in intracellular amastigotes, as well as axenic cultures of promastigotes and epimastigotes showed increased mitochondrial volume and disorganization of kinetoplast (Gonçalves et al. 2002).

Deolindo et al. (2005) found in their studies that the growth of *T. cruzi* epimastigotes was inhibited after treatment with the venom of *B. jararaca* and the IC<sub>50</sub> obtained was 10.00 µg/mL. Cellular molecular observations revealed increased mitochondrial volume, disorganization of kinetoplast, condensation of cytoplasm, and loss of mitochondrial membrane potential. The increase of these changes depends on the

time of exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane followed by permeabilization and activation of caspases.

Studies with several venoms revealed that they manifest themselves in different ways when compared to the native and irradiated forms. The crude venom of *B. jararaca* was highly effective against *L. amazonensis* promastigotes at the concentration of 40.00 µg/mL to about 100.0% lethality. In the native form, the IC<sub>50</sub> was 2.80 µg/mL and with the irradiated venom, the IC<sub>50</sub> increased to 4.80 µg/mL. The effect of radiation is not the same in all venoms. Some suffer little changes and others manifest their toxicity reduced by up to five times (Lourenço, 2000).

Several studies of snake venom cytotoxicities were conducted in intracellular parasites, but few studies have been reported with *C. d. terrificus*. We also found a scarcity in reports of anti-*Leishmania* activity of snake venoms on the *L. chagasi* species. The results showed that concentrations of 250.00 and 125.00 µg/mL of the *C. d. terrificus* and *B. jararaca* venoms had a higher mortality in the protozoa studied and showed low cytotoxicity. Thus, further study of the toxic effects of whole venom and isolated fractions of the analyzed snakes may contribute to further research on the pathophysiology and mechanism of action of these toxins in visceral leishmaniasis and Chagas disease. As well as provide new pharmacological and therapeutic tools for in vivo studies.

### Acknowledgments

We thank Dr. Heitor Franco de Andrade Junior for lending the laboratory for the experiment and the collaborations of Dr. Patrick Jack Spencer and Dr. Miriam Camargo Guarnieri providing the venoms needed for the experiments.

We would like also to thank from CNPq and FUNCAP for financial support.

### References

Almeida, M.A.O., Jesus, E.E.V., Sousa, M.L.B.A., Alves, L.C., Berne, M.E.A., Atta, A.M., 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*. 127, 227–232.

Andrade, L.O., Andrews, N.W., 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*. 03, 819–823.

Aslett, M., Aurrecoechea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M.J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M., Fowler, C.H., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W., Logan, F.J., Miller, J.A., Mitra, S., Myler, P.J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D.F., Ramasamy, G., Rogers, M.B., Roos, D.S., Roos, C., Sivam, D., Smith, D.F., Srinivasamoorthy, G., Stoeckert Jr, C., Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G., Wang, H., 2009. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. *Nucleic Acids Research*. 38, 457-462.

Bignarde, J.M.P., Sant'Ana, T.M., Monteiro, M.E.Z., Bottari, F., Neves, M.F., 2008. Doença de chagas em cães. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 11, 01-05.

Camargo, L.M.A., Barcinski, M.A., 2003. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*. 55, 34-37.

Dal Pai, V., Santo Neto, H., 1994. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: Barraviera, B. (Eds.), *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro, Publicações Científicas, pp 97-105.

Deolindo, P., Ferreira, A.S.T., Melo, E.J.T., Arnholdt, A.C.V., Souza, W., Alves, E.W., Da'Matta, R.A., 2005. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100, 33-38.

Goncalves, A.R., Soares, M.J., Souza, W., DaMatta, R., 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.

Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100, 811-827.

Lopes, A.H., Padrón, T.S., Dias, F.A., Gomes, M.T., Rodrigues, G.C., Zimmermann, L.T., Silva, T.L.A., Vermelho, A.B., 2010. Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. *The Open Parasitology Journal*. 04, 30-59.

Lourenço, C.O., 2000. Avaliação da atividade de diferentes venenos de serpentes, nativos ou irradiados, com radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ , quanto ao poder inibitório do crescimento de *leishmania (leishmania) amazonensis*. In: Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, p 91.

Melgarejo, A.R., 2003. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: França, F.O.S., Wen, F.H., Cardoso, J.L.C. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Savier, pp 33-61.

Michalick, M.S.M., Genaro, O., 2005. Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves, D.P., Melo, A.L., Linardi, P.M., Vitor, R.W.A. (Eds.), *Parasitologia Humana*. São Paulo, Atheneu, pp 56-72.

Miles, M.A., 2003. American trypanosomiasis (Chagas disease). In: Cook, G.C., Zumla, A. (eds.), *Manson's Tropical Diseases*. Londres, W.B. Saunders, pp 1325-1337.

Mordaski, R.Y.M., Souza, J.C.M., Costa, J.F., Freitas, K.C., Ferrari, L.P., Passoni, C.R.M., 2009. Leishmaniose visceral: ciclo biológico. *Cadernos da Escola de Saúde*. 03, 01-02.

Motta, M.C.M., Martins, A.C.A., Souza, S.S.A., Preta, C.M.C.C., Silva, R., Klein, C.C., Almeida, L.G.P., Cunha, O.L., Ciapina, L.P., Brocchi, M., Colabardini, A.C., Lima, B.A., Machado, C.R., Soares, C.M.A., Probst, C.M., Menezes, C.B.A., Thompson, C.E., Bartholomeu, D.C., Gradia, D.F., Pavoni, D.P., Grisard, E.C., Garboggini, F.F., Marchini, F.K., Luiz, G.F.R., Wagner, G., Goldman, G.H., Fietto, J.L.R., Elias, M.C.,

Goldman, M.H., Sagot, M.F., Pereira, M., Stoco, P.H., Mendonça, R.P., Teixeira, S.M.R., Maciel, T.E.F., Mendes, T.A.O., Ürményi, T.P., Souza, W., Schenkman, S., Vasconcelos, A.T.R., 2013. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. *Plos One Journal*. 08, e60209.

Nunes, R.K., 2008. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora Mato-Grossense. In: Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p 60.

Passero, L.F.D., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D., Toyama, M.H., 2007. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. Venoms. *Parasitology Research*. 101, 1365–1371.

Roy, S., Sandhu, A., Medina, A., Clawson, D.S., Wilson, J.M., 2012. Adenoviruses in Fecal Samples from Asymptomatic Rhesus Macaques, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 18, 1081–1088.

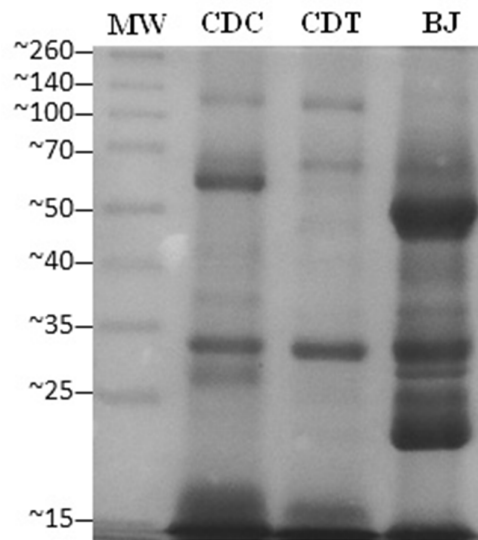
Silva, W.B., Soares, R.M., Machado, C., Freire, I.M.A., Silva, L.C.C.P., Moreira, S.B., Goldberg, D.W., Almosny, N.R.P., 2010. Bioquímica plasmática de cascavéis (*Crotalaria durissa* LINNAEUS, 1758) em cativeiro. *Ciência Rural*. 40, 2510-2514.

Tempone, A.G., Borborema, S.E.T., Andrade Jr, H.F., Gualda, N.C.A., Yogi, A., Carvalho, C.S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Fischer, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*. 12, 382–390.

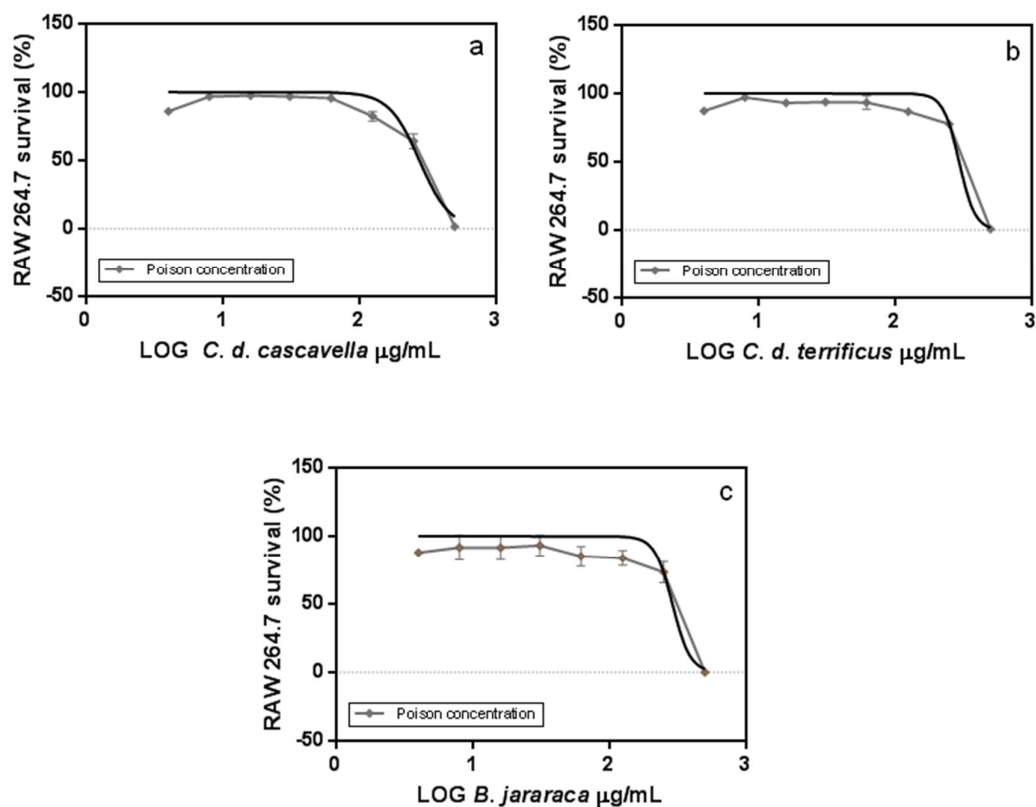
Ticli, F.K., 2006. Caracterização funcional e estrutural de uma L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida. In: Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, p 111.

Vieira, P.M., Francisco, A.F., Machado, E.M., Nogueira, N.C., Fonseca, K.S., Reis, A.B., Carvalho, A.T., Martins Filho, O.A., Tafuri, W.L., Carneiro, C.M., 2012. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. Plos One Journal. 07, e32912.

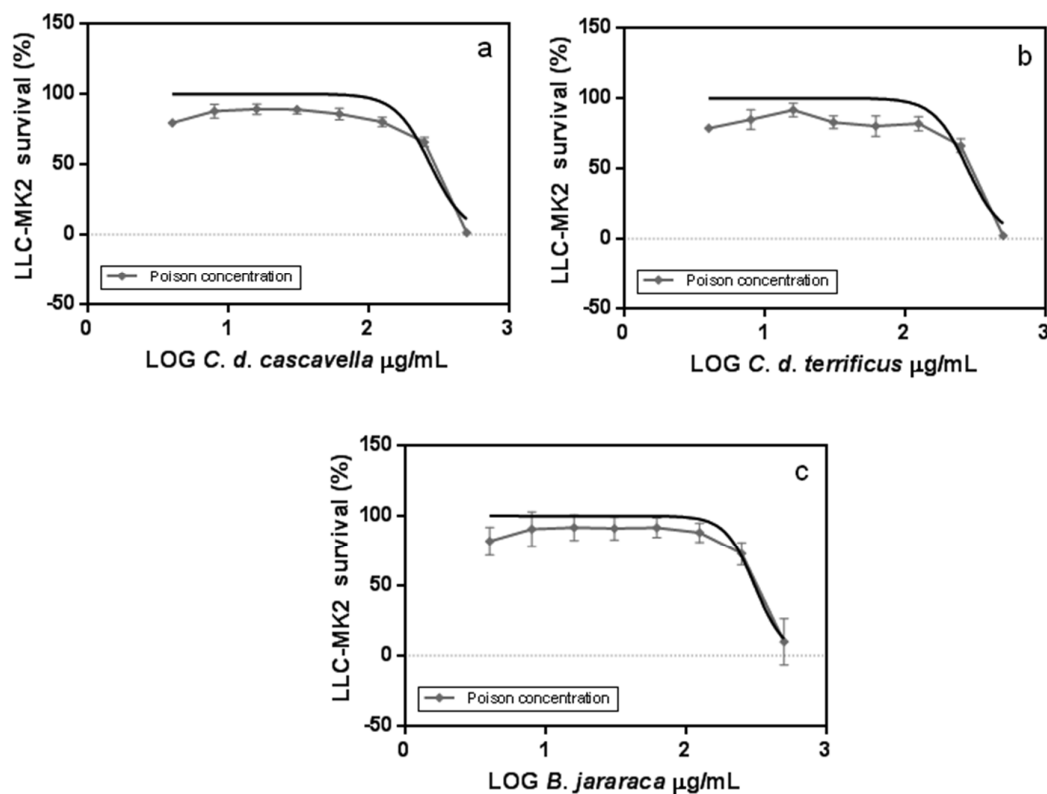
Wallace, F.G., 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Experimental Parasitology. 18, 124-193.

**Figures:**

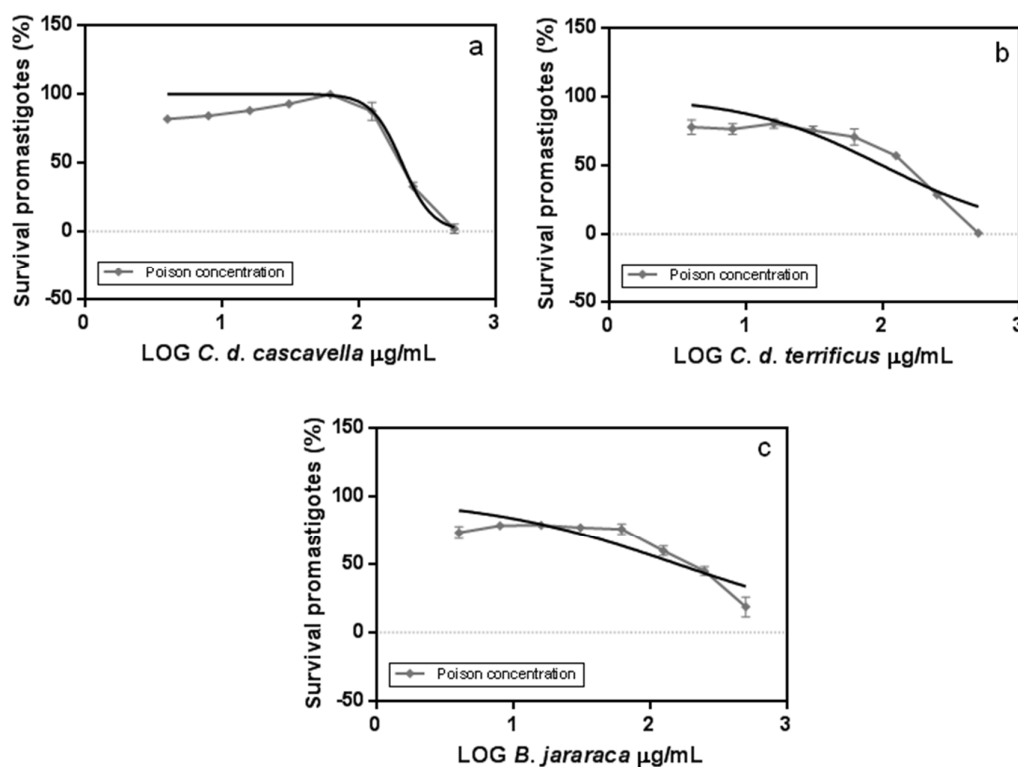
**Fig. 1.** Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at 15.0% in denaturing conditions. In the first well, the molecular weight was placed (MW); in the second, the *C. d. cascavella* (CDC) venom; in the third, the *C. d. terrificus* (CDT) venom and in the fourth, the venom of *B. jararaca* (BJ).



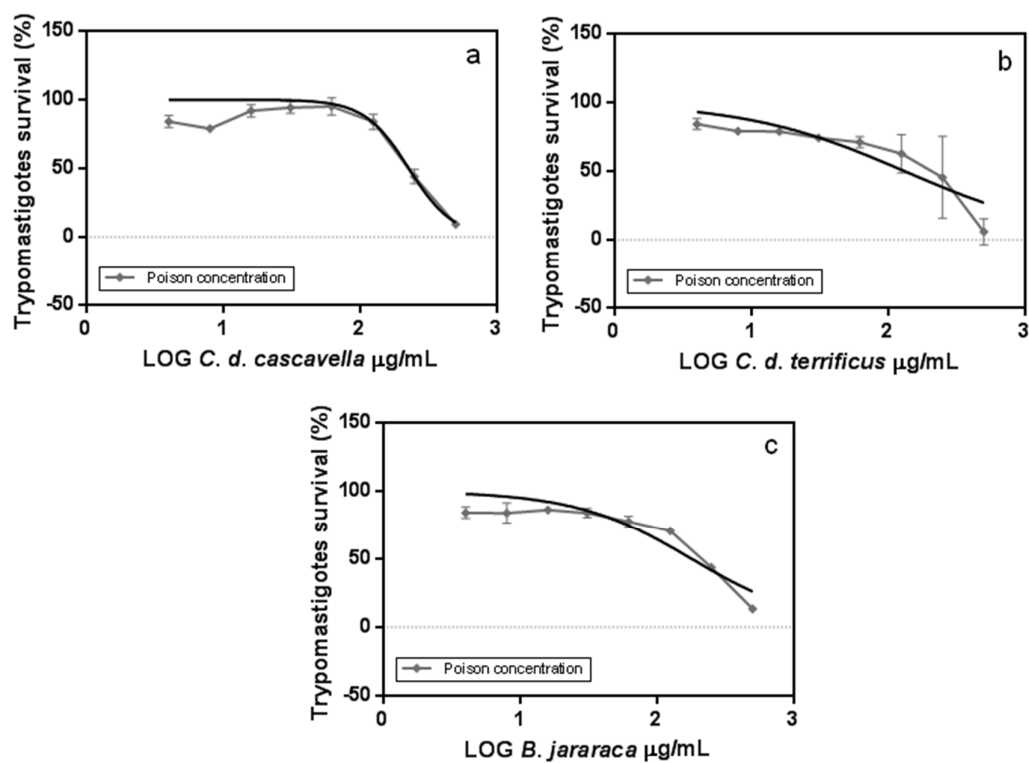
**Fig. 2.** Percentage of survival of RAW 264.7 cells in different concentrations of the venoms tested using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the *C. d. cascavella* venom on RAW 264.7 cells. (b) Effect of the *C. d. terrificus* venom on RAW 264.7 cells. (c) Effect of the *B. jararaca* venom on RAW 264.7 cells.



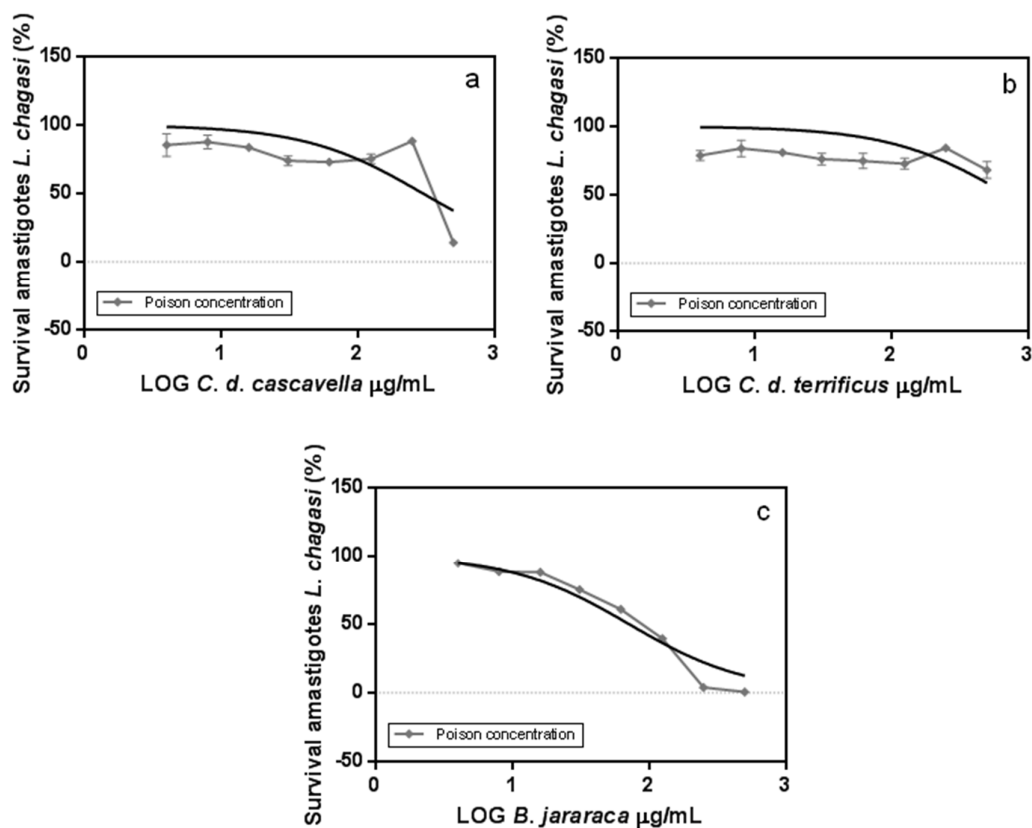
**Fig. 3.** Percentage of survival of LLC-MK2 cells in different venom concentrations using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of *C. d. cascavella* venom on LLC-MK2 cells. (b) Effect of *C. d. terrificus* venom on LLC-MK2 cells. (c) Effect of *B. jararaca* venom on LLC-MK2 cells.



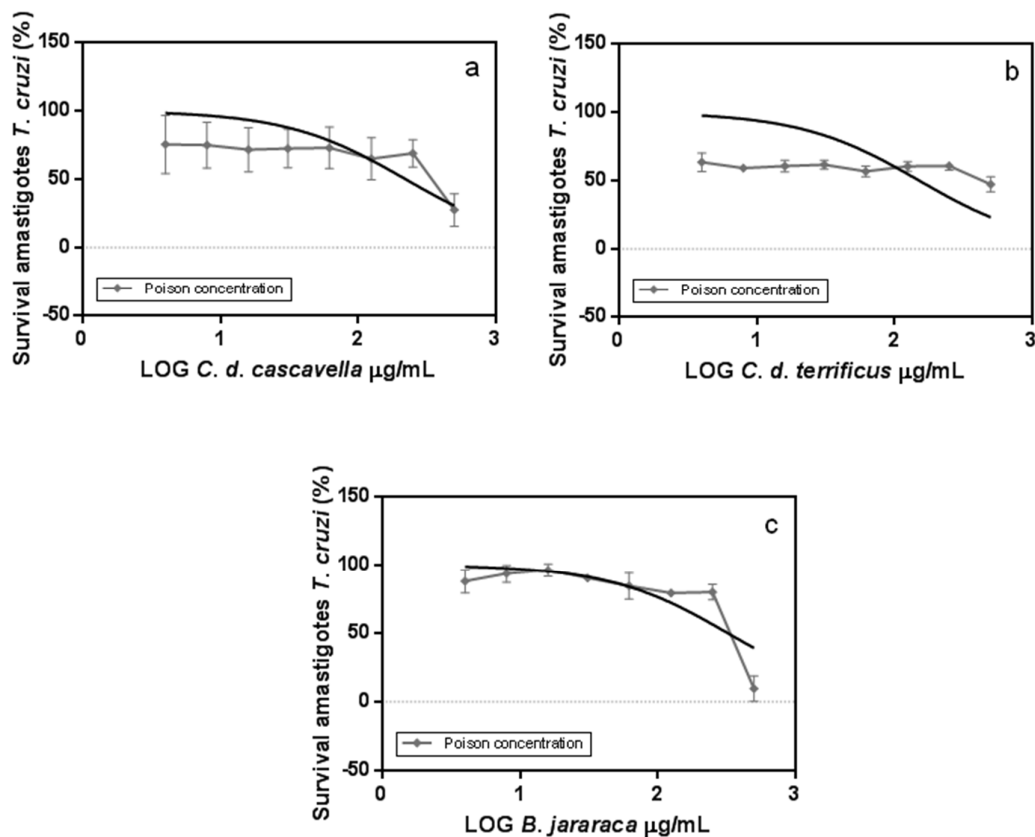
**Fig. 4.** Percentage of survival of *L. chagasi* promastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the *C. d. cascavella* venom in *L. chagasi* promastigotes. (b) Effect of the *C. d. terrificus* venom in *L. chagasi* promastigotes. (c) Effect of the *B. jararaca* venom in *L. chagasi* promastigotes.



**Fig. 5.** Percentage of survival of *T. cruzi* trypomastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the *C. d. cascavella* venom in *T. cruzi* trypomastigotes. (b) Effect of the *C. d. terrificus* venom in *T. cruzi* trypomastigotes. (c) Effect of the *B. jararaca* venom in *T. cruzi* trypomastigotes.



**Fig. 6.** Percentage of survival of *L. chagasi* amastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the *C. d. cascavella* venom in *L. chagasi* amastigotes. (b) Effect of the *C. d. terrificus* venom in *L. chagasi* amastigotes. (c) Effect of the *B. jararaca* venom in *L. chagasi* amastigotes.



**Fig. 7.** Percentage of survival of *T. cruzi* amastigotes in different concentrations of the venoms using a non-linear regression curve with a confidence interval of 95.0%. (a) Effect of the *C. d. cascavella* venom in *T. cruzi* amastigotes. (b) Effect of the *C. d. terrificus* venom in *T. cruzi* amastigotes. (c) Effect of the *B. jararaca* venom in *T. cruzi* amastigotes.

## 7 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos demonstraram que os venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* possuem atividade leishmanicida e tripanocida podendo ser considerados como uma nova ferramenta terapêutica e farmacológica de pesquisa para o tratamento da leishmaníase visceral e da tripanossomíase americana.
- Os venenos estudados apresentam proteínas com pesos moleculares semelhantes com aproximadamente 33 KDa. Os venenos do gênero *Crotalus* apresentaram maior semelhança molecular com substâncias de pesos moleculares aproximados entre si.
- Os venenos estudados tiveram 100% de citotoxicidade em células RAW 264.7 e LLC-MK2 na concentração de 500 µg/mL. As demais concentrações dos venenos, a citotoxicidade se encontrou abaixo de 50% em ambas as células.
- Dentre os venenos estudados a *Crotalus durissus terrificus* apresentou maior índice de mortalidade em formas promastigotas e a *Bothrops jararaca* apresentou melhor atividade contra amastigotas de *Leishmania chagasi*.
- Sobre formas tripomastigotas, o veneno da *Bothrops jararaca* apresentou maior toxicidade enquanto em amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o veneno da *Crotalus durissus terrificus* expressou a maior toxicidade.

## 8 PERSPECTIVAS

Venenos de serpentes possuem potencial farmacológico de amplo espectro, sendo capazes de fornecer novas substâncias ativas que viabilizem o controle destas e outras doenças, e que apresentem efeitos adversos reduzidos. O aprofundamento das pesquisas e a investigação de compostos mais seletivos nos induz a continuar com pesquisas na possível descoberta de estudos e resultados *in vitro* e *in vivo* para buscar uma nova ferramenta no tratamento da leishmaniose visceral e a tripanossomíase americana que acometem os homens e animais domésticos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÁ, R. E. S. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia para gravidez na mulher portadora de cardiopatia: Doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 110-178, 2009.

ADADE, C.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO, T. P. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 138, p. 46–58, 2011.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, p. 953-960, 1988.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, C.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p.381-382, 2009.

ASSIS, V. P.; RIBEIRO, V. M.; RACHID, M. A.; CASTRO, A. C. S.; VALLE, G. R. Dogs with *Leishmania chagasi* infection have sêmen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 2, p. 183-186, 2010.

BARBOSA-FERREIRA, J. M.; GUERRA, J. A. O.; SANTANA FILHO, F. S.; MAGALHÃES, B. M. L.; COELHO, L. I. A. R.; BARBOSA, M. G. V. Acometimento cardíaco em casos de doença de Chagas aguda da Amazônia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 6, p. 147-149.

BARROS, L. C. Atividade coagulante e da toxicidade da giroxina nativa e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. [Dissertação de Mestrado]. **Doenças Tropicais**. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 82 f., 2010.

BIGNARDE, J. M. P.; SANT'ANA, T. M.; MONTEIRO, M. E. Z.; BOTTARI, F.; NEVES, M. F. Doença de Chagas em cães. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 01-05, 2008.

BOGGIATTO, P. M.; CORLEY, K. N. G.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in north america. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 1019, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabricam e dá outras providências**. Disponível em: <[http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop\\_mostrarintegra;jsessionid=24180BB C47C952DD5FA63F43CA068716.node1?codteor=810221&filename=LegislacaoCitada+-PL+7827/2010](http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=24180BB C47C952DD5FA63F43CA068716.node1?codteor=810221&filename=LegislacaoCitada+-PL+7827/2010)>. Acesso em: 10 de março de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília; 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília (DF); 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Caderno 10, 7. ed. – Brasília: MS, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **II Fórum de Discussão Sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Brasília/DF, 10 f., 2009.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle, Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 7, n. 71, p. 86-92, 2007.

CAMILLO, M. A. P.; PAES, P. C. A.; TRONCONE, L. R. P.; ROGERO, J. R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon**, v. 39, p. 843-853, 2001.

CASTRO, F. O. F. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico humano. [Dissertação de Mestrado]. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás. 67 f., 2011.

CAVALCANTI, M. P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR

em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães. [Tese de Doutorado]. **Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**, Fundação Oswaldo Cruz – PE. 139 f., 2008.

COMINETI, M. R. Estudo dos efeitos de metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica. [Tese de Doutorado]. **Ciências Fisiológicas**. Universidade Federal de São Carlos – SP. 209 f., 2004.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, C. H. N.; WERNECK, G. L.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; AGUIAR, G. B.; CARVALHO, A. S. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386-92, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, R. J.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 02, p. 21-26, 2012.

CUNHA, K. C. S. Efeitos da fosfolipase A2 isolada do veneno da serpente *Lachesis muta* na sobrevivência das células ganglionares da retina de ratos: vias de sinalização envolvidas. [Dissertação de Mestrado]. **Neuroimunologia**. Universidade Federal Fluminense – Niterói. 94 f., 2010.

DAL PAI, V.; SANTO NETO, H. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Ed. EPUB, 1994. p. 411.

DANIEL NETO, R. B. **Tripanossomíase canina: relato de caso**. Monografia, 2009, 18f. (Pós-Graduação em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais). Universidade Castelo Branco, Instituto Qualittas: Mato Grosso do Sul.

DUARTE, I.; MACIEL, B. L.; MONTEIRO, G. R.; QUEIROZ, J. W.; NASCIMENTO, E. L. T.; LACERDA, H. G.; BRAZ, R. F. S.; SOUSA, O. N.; XIMENES, M. F. F. M.; SAMPAIO, G. A.; GOMES, C. E. M.; PONTES, N. N.; MARTINS, D. R.; BLACKWELL, J. M.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERÔNIMO, S. M. B. Leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, 2008.

FRANÇA, F. O. D. E.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, L. C.; COSTA, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003. p. 72-86.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Animais peçonhentos**. Cartilha ofidismo, 3ª ed., 2009. Belo Horizonte.

GARCIA, A. M.; REBELO, J. M. M.; CALDAS, A.; GOMES, R.; VINHAS, V.; BARRAL, A.; SILVA, A. A. M.; COSTA, J. M. L. Historia natural da infecção causada por *Leishmania chagasi* em cães (*canis familiares*) domiciliados em área endêmica da Ilha de São Luís – Maranhão, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 195, p. 147-155, 2009.

GARCIA, S. B. Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 4, p. 249-251, 2009.

GONÇALVES, L. R.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 9, p. 101-107, 2000.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTTDENKER N. L.; CHAVES, L. F.; CALZADA, J. E.; SALDAÑA, A.; CARROLL, C. R. Host life history strategy, species diversity, and habitat influence *Trypanosoma cruzi* vector infection in changing landscapes. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-11, e1884, 2012.

GUERRA, J. A. O.; BARBOSA, M. G. V.; LOUREIRO A. C. S. P.; COELHO, C.P.; ROSA, G. G.; COELHO, L. I. A. C. R. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 9, p. 2215-2223, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI RM, editor. **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. Chichester: Wiley & Sons. p. 321-52, 1997.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVDO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

INSTITUTO BUTANTAN. **Animais Peçonhentos: Serpentes. Série Didática 5**. São Paulo, SP s/d. Disponível em: <<http://www.toxnet.com.br/download/serpentes.pdf>>. Acesso em: 08 outubro de 2013.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1-24, 1990.

LAINSON, R; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100, p. 811-827, 2005.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. **Parasitologia Humana**, São Paulo: Atheneu. p. 85-108, 2005.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 69, p. 14-18, 2009.

LEITE, R. S. Efeito de uma fosfolipase A2 Lisina 49, ACL miotoxina, do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* sobre o transporte de água em bexiga urinária isolada de sapo. [Tese de Doutorado]. **Ciências Fisiológicas**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 97f., 2004.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 790-802, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxin from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.

LOPES, A. H.; SOUTO-PADRÓN, T.; DIAS, F. A.; GOMES, M. T.; RODRIGUES, G. C.; ZIMMERMANN, L. T.; SILVA, T. L. A.; VERMELHO, A. B. Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 30-59, 2010.

LOURENÇO JR., A.; CRESTE, C. F. Z.; BARROS, L. C.; SANTOS, L. D.; PIMENTA, D. C.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JR., R. S. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, v. 69, p. 75–81, 2013.

LUCAS, E. P. R. Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional. [Dissertação de Mestrado]. **Vigilância Sanitária**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro. 104 f., 2009.

MAINERI, M. M. Avaliação da potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* em células mononucleares do sangue periférico humano. [Dissertação de Mestrado]. **Ciências Ambientais e Saúde**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás – Goiânia. 110 f., 2012.

MARCOLINO, M. M. K. Avaliação de atividade leishmanicida in vitro de heteropolissacarídeos ácidos: não sulfatados e naturalmente sulfatados. [Dissertação de Mestrado] **Ciências Biológicas**. Universidade Federal do Paraná - PR. 80 f., 2010.

MARQUES, I. C. Doença de Chagas, doença do Brasil. Revista **História Ciências Saúde**, v. 20, n. 1, p. 337-345, 2013.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR., A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 591-596, 2012.

MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 200-210, n. 1736, 2005.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, L. C.; COSTA, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Savier, 2003. p. 33-61.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e Manejo de serpentes. IN: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLICEIRA, R. S. **Animais de laboratório. Criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. P. 175-198p.

MORDASKI, R. Y. M.; SOUZA, J. C. M.; COSTA, J. F.; FREITAS, K. C.; FERRARI, L. P.; PASSONI, C. R. M. Leishmaniose visceral: ciclo biológico. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 03, p. 01-02, 2009.

MURARI, S. K.; FREY, F. J.; FREY, B. M.; GOWDA, T. V.; VISHWANATH, B. S. Use of *Pavo cristatus* feather extract for the better management of snakebites: neutralization of inflammatory reactions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 229-237, 2005.

NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A. M.; CARLOS, F. P.; LIMA, C. J.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. **Lasers In Medical Science**, v. 27, p.65-70, 2012.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**. v. 5, n. 67, 2012.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Tripanossomíase americana. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3º ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 1266 – 1267, 2006.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. **Parasitologia Humana**, 12ª ed. São Paulo: Atheneu; 2012.

OLIVEIRA, A. K. Análise dos elementos estruturais de metaloproteinases das classes P-I e P-III do veneno de *Bothrops jararaca* importantes para suas interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular. [Dissertação de Mestrado]. **Biotecnologia**. Universidade de São Paulo. 47 f., 2009.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 188-93, 2010.

OLIVEIRA, N. B.; PIRES JR., O. R. **Venenos e peçonhas animais: aplicações tecnológicas e Biopirataria**. 6ª Amostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC - Goiás. 20 p., 2011.

PAPICH, M. G. **Manual Saunders Terapêutico Veterinário**, 2a edição. São Paulo: Med Vet, 2009.

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. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1365–1371, 2007.

PATÍÑO, A. C.; PEREAÑEZ, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Toxicon**, v. 63, p. 32-43, 2013.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; GOMES, M. L. S.; LIMA JR, F. E. F. Treatment of visceral leishmaniasis and american cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PEREIRA, C. C. Duração da imunidade vacinal na leishmaniose visceral canina: padrão de citocinas sintetizadas por leucócitos circulantes após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. [Dissertação de Mestrado]. **Ciências da Saúde**. Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz. 97 f., 2013.

PÉREZ-GUTIÉRREZ, E.; AGRELO, R. S.; FIGUEROA, R. Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por Alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 512-514, 2006.

PINHO, F. M.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snakebite-induced kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28, p. 354-62, 2008.

PINTO, A. M. T. Infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* modifica o padrão de secreção de cardiomiócitos. [Dissertação de Mestrado]. **Biologia Celular**. Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte. 85 f., 2006.

POLGAR, J.; CLEMETSON, J. M.; KEHREL, B. E.; WIEDMANN, M.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13576-13583, 1997.

PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F.; CALDEIRA, D. I.; PAZ, G. F.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Families of serine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 19-61, 1994.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2011.

RIVERO, J. V. R. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu* em células mononucleares do sangue periférico. [Dissertação de Mestrado]. **Ciências Ambientais e Saúde**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás - GO. 114 f., 2010.

ROCHA, A. G. **Leishmaniose visceral canina no Rio Grande do Sul: Revisão bibliográfica**. Monografia, 2012. 47 p. (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.

SGRINOLLI, L.; MENDES, G.; CARLOS, G.; BURDMANN, E. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. **Nephron Clinical Practice**, v. 119, p. 131-7, 2011.

SHERDING, R. G. Toxoplasmosis and other systemic protozoal infections. In: **Saunders Manual of Small Animal Practice**, 3ª ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006.

SILVA R. N. Leishmaniose visceral: Estudo da carga parasitária em cães submetidos a tratamento com miltefosine (hexadecilfosfocolina). [Dissertação de Mestrado]. **Ciências e Saúde**. Universidade Federal do Piauí - Teresina. 67 f., 2009.

SILVA, A. R.; VIANA, G. M. C.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M. D. S. D.; COSTA, J. M. L. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 359-368, 1997.

SILVA, B. C. **Alterações clínicas e patológicas da leishmaniose visceral canina**.

Monografia, 2009. 72 p. (Graduação em Medicina Veterinária). Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais: Belo Horizonte.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, R. N. Leishmaniose visceral: estudo da carga parasitária em cães submetidos a tratamento com miltefosine (hexadecilfosfocolina). [Dissertação Mestrado]. Universidade Federal do Piauí. 67 f., 2009.

SILVA, W. B.; SOARES, R. M.; MACHADO, C.; FREIRE, I. M. A.; SILVA, L. C. C. P.; MOREIRA, S. B.; GOLDBERG, D. W.; ALMOSNY, N. R. P. Bioquímica plasmática de cascavéis (*Crotalus durissus linnaeus*, 1758) em cativeiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2510-2514, 2010.

SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas**. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home)>. Acesso em: 10 de outubro de 2013.

SOUZA, V. M. M.; JULIÃO, F. S.; NEVES R. C. S.; MAGALHÃES, P. B.; BISINOTTO, T. V.; LIMA, A. S.; OLIVEIRA, S. S.; MOREIRA JR., E. D. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, estado da Bahia, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, 78 p., 2008.

SUCCAR, B. B. **Avaliação do perfil antitrombótico das desintegrinas recombinantes do veneno de *Bothrops jararaca***. Monografia, 2012. 53p. (Graduação em Tecnologia em biotecnologia). Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste: Rio de Janeiro.

SUNDAR, S.; PAI, K.; SAHU, M.; KUMAR, V.; MURRAY, W. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, p. 19-23, 2002.

TEIXEIRA, N. B. Avaliação do efeito da crotoxina na dor e nos sinais clínicos de animais portadores de encefalomielite autoimune experimental, um modelo animal de esclerose múltipla. [Dissertação de Mestrado]. **Toxinologia**. Instituto Butantan, São Paulo. 84 f., 2012.

TICLI, F. K. Caracterização funcional e estrutural de uma L-Aminoácido Oxidase do Veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitária e

bactericida. [Tese de doutorado]. **Ciências Farmacêuticas**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. 111 f., 2006.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; MENEZES, R. R. P. P. B.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; OLIVEIRA, M. F.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 614-622, 2010.

TROY, G. C. American leishmaniasis. In: BONAGURA; TWEDT. **Kirk's Current Veterinary Therapy XIV**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009.

TURCHETTI, A. P.; SANTOS, R. L.; PAIXÃO, T. A. Leishmaniose visceral canina, doença de múltiplas faces. **Cães e Gatos**, v. 29, n. 170, p. 18-24, 2013.

VARGAFTIG, B. B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.; CHIGNARD, M.; CHEVANCEM, L. G. Convulxin induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. **European Journal of Pharmacology**, v. 92, p. 57-68, 1983.

VIEIRA, P. M. A.; FRANCISCO, A. F.; MACHADO, E. M. M.; NOGUEIRA, N. C.; FONSECA, K. S.; REIS, A. B.; CARVALHO, A. T.; MARTINS-FILHO, O. A.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e32912.

WERNECK, G. L.; PEREIRA, T. J. C. F.; FARIAS, G. C.; SILVA, F. O.; CHAVES, F. C.; GOUVÊA, M. V.; COSTA, C. H. N.; CARVALHO, F. A. A. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. **Epidemiologia e Serviços de Saúde Brasília**, v. 17, n. 2, p. 87-96, 2008.

WSPA. Sociedade Mundial de Proteção Animal. **Leishmaniose visceral canina um manual para o clínico veterinário**. Rio de Janeiro, 20 f., 2011.