

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ANNA BEATRIZ VIANA

IMPACTO DO EFEITO DE MOLÉCULA SINTÉTICA NA INTERAÇÃO DE
TRIPANOSOMATÍDEOS COM CÉLULAS DE MAMÍFERO

UBERLÂNDIA

2025

ANNA BEATRIZ VIANA

**IMPACTO DO EFEITO DE MOLÉCULA SINTÉTICA NA INTERAÇÃO DE
TRIPANOSOMATÍDEOS COM CÉLULAS DE MAMÍFERO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para a obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientador: Me. Lucas Ian Veloso Correia

UBERLÂNDIA

2025

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
pois de vocês aprendi a fé que guia,
a esperança que fortalece e
o amor que sustenta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que me concedeu saúde, discernimento e serenidade para enfrentar toda a jornada. Sem sua graça e seu amparo tudo seria mais difícil.

Aos meus pais, Neusa e Julio, por cada sacrifício silencioso, cada renúncia e cada palavra de incentivo. Vocês são a base sobre a qual construí meus sonhos, e este trabalho é, em parte, fruto do amor que sempre me ofereceram. Obrigada por nunca me desampararem, sem o apoio incondicional de vocês não poderia ser quem sou hoje.

Aos meus irmãos, Anna Carolina e Marcus, por todo companheirismo, incentivo e suporte, que contribuíram para que eu continuasse em meu caminho.

Ao meu orientador, Dr. Claudio Vieira da Silva pelo acolhimento, confiança, ensinamentos e por ser um exemplo de profissional, sua perseverança e seu amor pela ciência me inspiram.

Ao meu coorientador, Ms. Lucas Ian Veloso Correia sou grata pelo suporte para a realização dessa pesquisa.

A minha coorientadora, Dra. Teresiana Velikkakam, sou imensamente grata pela paciência, esforço e pelo conhecimento compartilhado, por sempre acreditar no potencial deste trabalho. Obrigada por não deixar que eu fosse abalada diante das dificuldades que surgiam e por nunca medir esforços.

À minha amiga e companheira de laboratório, Júlia Berlofa, pela amizade, pela cumplicidade e pela parceria constante. A caminhada teria sido muito mais difícil sem sua presença ao meu lado.

Aos meus amigos de curso, que levarei em meu coração e a quem sou muito grata.

À toda a equipe do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pelo companheirismo. Especialmente, a Élide, Cecília e Anna Clara, que deram suporte quando preciso.

Agradeço também ao corpo docente da UFU por todos os conhecimentos compartilhados durante esses quatro anos de curso.

A UFU, o ICBIM e o IBTEC que proporcionaram estrutura para realização dessa graduação e deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente em minha jornada até aqui!

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, continua sendo um importante problema de saúde pública, sobretudo em países da América Latina, onde representa uma das principais endemias parasitárias. Apesar de décadas de estudo, o tratamento permanece restrito a poucas drogas, que apresentam eficácia limitada e relevantes efeitos adversos, o que motiva a busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, moléculas bioativas de origem animal têm despertado interesse, incluindo compostos derivados de venenos de insetos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de um peptídeo isolado do veneno da formiga *Ectatomma tuberculatum* frente a formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Para isso, foram conduzidos ensaios de viabilidade celular em células LLCMK2 e em TCT, além de ensaios de invasão e de multiplicação intracelular, permitindo investigar o impacto do composto em diferentes etapas do ciclo do parasito. Os resultados mostraram que o peptídeo reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente, afetando tanto as células hospedeiras quanto os tripomastigotas. Além disso, observou-se que o tratamento comprometeu a eficiência de invasão do parasito e reduziu significativamente sua multiplicação intracelular, sugerindo que o peptídeo interfere em mecanismos essenciais da interação parasito-hospedeiro. Esses achados indicam que o composto não atua apenas como agente citotóxico, mas pode modular processos críticos do ciclo do *T. cruzi*, levantando a hipótese de interação com proteínas de superfície ou vias associadas ao processo de invasão. Dessa forma, os resultados obtidos reforçam o potencial de peptídeos derivados de venenos de insetos como candidatos promissores para a descoberta de novas estratégias terapêuticas frente à Doença de Chagas, embora sejam necessários estudos adicionais para elucidar seus mecanismos de ação e validar sua eficácia em modelos *in vivo*.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*, Moléculas bioativas, Interação parasito-hospedeiro, Bioensaios *in vitro*.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, remains a major public health concern, particularly in Latin American countries, where it represents one of the main parasitic endemics. Despite decades of research, treatment is still limited to a few drugs with restricted efficacy and significant adverse effects, which highlights the need for new therapeutic alternatives. In this context, bioactive molecules of animal origin have drawn attention, including compounds derived from insect venoms. This study aimed to evaluate the activity of a peptide isolated from the venom of the ant *Ectatomma tuberculatum* against tissue culture-derived trypomastigotes (TCT) of the Tulahuen strain of *T. cruzi*. For this purpose, cell viability assays were performed in LLCMK2 cells and TCT, in addition to invasion and intracellular multiplication assays, in order to investigate the compound's impact on different stages of the parasite's cycle. The results demonstrated that the peptide reduced cell viability in a dose-dependent manner, affecting both host cells and trypomastigotes. Furthermore, treatment compromised the parasite's invasion efficiency and significantly reduced its intracellular multiplication, suggesting that the peptide interferes with essential mechanisms of the host-parasite interaction. These findings indicate that the compound does not act solely as a direct cytotoxic agent but may modulate critical processes in the *T. cruzi* life cycle, raising the hypothesis of interaction with surface proteins or pathways associated with the invasion process. Thus, the results reinforce the potential of insect venom-derived peptides as promising candidates for the development of new therapeutic strategies against Chagas disease, although further studies are needed to clarify their mechanisms of action and validate efficacy in *in vivo* models.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Bioactive molecules. Host-parasite interaction. *In vitro* bioassays.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	11
Figura 2. Avaliação da toxicidade em células LLCMK2 expostas ao Peptídeo B.	20
Figura 3. Avaliação da toxicidade nas formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com o Peptídeo B	21
Figura 4. Porcentagem de invasão de <i>Trypanosoma cruzi</i> em células LLCMK2 após tratamento com o Peptídeo B, considerando três condições experimentais.	22
Figura 5. Porcentagem de invasão de <i>Trypanosoma cruzi</i> em células LLCMK2 tratadas com diferentes concentrações do Peptídeo B.	23
Figura 6. Efeito do Peptídeo B na multiplicação de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2 Epidemiologia e Formas de Transmissão	11
1.3 Manifestações clínicas e tratamento	12
1.4 <i>Ectatomma tuberculatum</i>	Erro! Indicador não definido.
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. METODOLOGIA	Erro! Indicador não definido.
4.1 Cultura Celular	15
4.2 Parasitos	16
4.3 Avaliação da toxicidade em células LLCMK2	16
4.4 Avaliação da toxicidade em <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
4.5 Ensaio de Invasão	17
4.6 Ensaio de Multiplicação.....	18
4.7 Análise Estatística	19
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Avaliação da toxicidade em células LLCMK2	19
5.2 Avaliação da toxicidade em <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
5.3 Ensaio de Invasão Celular.....	21
5.4 Ensaio de Multiplicação.....	23
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO	26
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, descrito pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909 (De Souza *et al.*, 1984). Este parasita afeta mais de 7 milhões de pessoas no mundo e está associado a elevados custos sociais e econômicos, sendo classificado como doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2025).

T. cruzi apresenta tropismo por diversos tipos celulares, com preferência por células musculares lisas (Liu; Von Bargen; McCall, 2021). No presente estudo, foi utilizada a cepa Tulahuen, pertencente à Unidade Discreta de Tipagem DTU VI (híbrida), amplamente utilizada em pesquisas pela alta virulência experimental e relevância clínica nas regiões do Cone Sul (Hakim *et al.*, 2024). Essa cepa apresenta rápida replicação em culturas celulares, elevada resistência ao estresse oxidativo e alta atividade enzimática, características que favorecem sua sobrevivência em condições adversas (Moraes *et al.*, 2016; Mielniczki-Pereira *et al.*, 2007). Além disso, a cepa Tulahuen em questão foi editada para expressar a enzima β -galactosidase.

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados. No inseto vetor, as formas tripomastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo transformam-se em epimastigotas no intestino médio, onde se multiplicam. Ao migrarem para o intestino posterior, sofrem estresse nutricional e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos — a forma infectante eliminada nas fezes durante a próxima alimentação (Teixeira *et al.*, 2011).

No hospedeiro vertebrado, esses tripomastigotas penetram por lesões na pele ou mucosas, invadem células nucleadas e se diferenciam em amastigotas, que se replicam no citoplasma. Posteriormente, voltam a se transformar em tripomastigotas, que são liberados na corrente sanguínea, perpetuando o ciclo (De Souza, 2000; Mortara *et al.*, 2008; Rassi; Rassi Jr., 2008; Hernández-Osorio *et al.*, 2010; Moretti; Mortara; Schenkman, 2020; Zuma; Dos Santos Barrias; De souza, 2020).

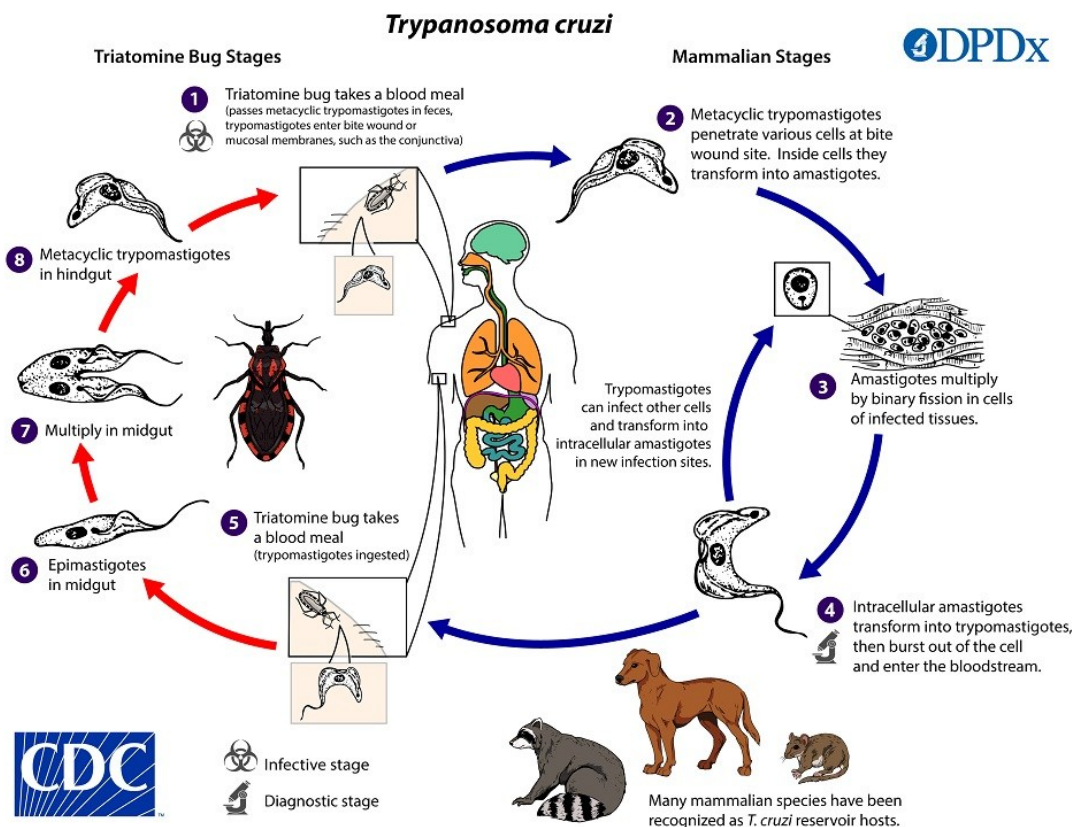


Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. **Fonte:** CDC.

1.2 Epidemiologia e Formas de Transmissão

A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, mas nas últimas décadas tornou-se um problema de saúde global devido à migração de indivíduos infectados para regiões não endêmicas, incluindo Estados Unidos, países da Europa, Japão e Austrália. Estima-se que mais de 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, com cerca de 75 milhões em risco de contrair a doença (WHO, 2025). No Brasil, a prevalência diminuiu significativamente após o sucesso de programas de controle vetorial, como o Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas, mas ainda ocorrem novos casos, principalmente associados à transmissão oral (OPAS/OMS, 2016).

As formas de transmissão incluem a vetorial, por meio da penetração de tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes de triatomíneos, que entram por lesões cutâneas ou mucosas; a oral, pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com o parasita, como caldo de cana ou açaí (Dias *et al.*, 2006); a congênita, com transmissão vertical de mãe infectada para o feto, responsável por milhares de casos anuais em países não

endêmicos; a transfusional e por transplante, associada à falta de triagem adequada em bancos de sangue ou órgãos; e a acidental, geralmente em laboratórios de pesquisa. A contribuição relativa de cada via de transmissão varia conforme a região. Em áreas onde o vetor foi controlado, a transmissão congênita e oral assumem maior relevância, enquanto em regiões rurais da Bolívia, Paraguai e partes da Argentina, o ciclo vetorial doméstico ainda é ativo (OPAS, 2016). A mudança desse perfil epidemiológico exige vigilância contínua, pois novos vetores e espécies silvestres de triatomíneos podem recolonizar áreas previamente controladas, representando risco de reemergência da doença.

1.3 Manifestações clínicas e tratamento

A infecção por *T. cruzi* apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda dura em média seis a oito semanas e caracteriza-se por alta parasitemia. Os sintomas mais comuns incluem febre persistente, linfadenopatia, mal-estar, hepatoesplenomegalia e, em alguns casos, sinais dermatológicos como o chagoma de inoculação ou o sinal de Romaña. Essa fase pode ser assintomática em até 70% dos casos, dificultando o diagnóstico precoce (Pérez-Molina; Molina, 2018; Chadalawada *et al.*, 2020; WHO, 2015).

O tratamento na fase aguda baseia-se principalmente no uso do benzonidazol, um derivado nitroimidazólico com eficácia comprovada na redução da parasitemia. Apesar disso, efeitos adversos como dermatite, neuropatia periférica e sintomas gastrointestinais podem levar à interrupção do tratamento em até 20% dos pacientes (Murta *et al.*, 1998; Villarreal *et al.*, 2009). Estudos recentes investigam novos fármacos, incluindo derivados do benzonidazol com menor toxicidade, inibidores de cisteíno-proteases e compostos naturais com ação antiparasitária, que vêm sendo testados em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Na fase crônica, que pode permanecer indeterminada por décadas, o parasita persiste em níveis baixos nos tecidos, provocando inflamação crônica e danos progressivos. As manifestações clínicas mais graves ocorrem nas formas cardíaca e digestiva. A forma cardíaca é caracterizada por arritmias, insuficiência cardíaca e risco de morte súbita devido à destruição progressiva do miocárdio (Bestetti; Muccillo, 1997; Bilate; Cunha-Neto, 2008). A forma digestiva inclui megaesôfago e megacólon, resultantes da

destruição do plexo nervoso entérico, levando a disfagia grave, constipação crônica e complicações secundárias.

Estima-se que até 30% dos pacientes desenvolvam comprometimento cardíaco e cerca de 10% apresentem manifestações digestivas (Echavarría *et al.*, 2021). O manejo da fase crônica é sintomático e multidisciplinar, podendo incluir medicamentos para insuficiência cardíaca, dispositivos como marcapassos ou cardiodesfibriladores, e intervenções cirúrgicas para complicações digestivas. Apesar dos avanços, a erradicação do parasita nessa fase permanece um desafio, estimulando pesquisas em terapias combinadas que associam antiparasitários a moduladores da resposta imune.

1.4 *Ectatomma tuberculatum*

A espécie *Ectatomma tuberculatum*, pertencente à subfamília Ectatomminae, é uma formiga neotropical amplamente distribuída na América Central e América do Sul, ocupando desde áreas florestais até ambientes abertos e modificados pelo homem (WIKIPEDIA, 2025). Trata-se de um inseto com hábitos generalistas e comportamento predominantemente predatório, realizando o forrageamento de forma solitária. Entretanto, também é capaz de adotar estratégias de emboscada, como observado na captura de abelhas sem ferrão nas proximidades das entradas de seus ninhos (Ostwald; Ruzi; Baudier, 2018).

O veneno de *E. tuberculatum* apresenta uma composição complexa, rica em moléculas bioativas, incluindo peptídeos e proteínas com potencial farmacológico. Dentre essas substâncias, destacam-se as ectatomininas, toxinas que promovem a formação de canais em membranas celulares, alterando de forma irreversível a permeabilidade iônica (WIKIPEDIA, 2025; Arantes *et al.*, 2018). Análises proteômicas indicam a presença de diversas enzimas e proteínas com efeito citotóxico, despertando interesse para investigações voltadas ao estudo de doenças parasitárias e ao desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas (Arantes *et al.*, 2018). Entre as principais toxinas identificadas nesse veneno está o ectatomin, constituído por duas cadeias distintas, denominadas A e B, que podem ser expressas de forma independente. Estudos pioneiros demonstraram que essas cadeias apresentam propriedades bioativas relevantes, sendo possíveis de serem produzidas por síntese recombinante para análises funcionais (Shilov *et al.*, 1997). Nesse contexto, a cadeia B, foco do presente, estudo tem despertado especial interesse por seu potencial efeito sobre células e micro-organismos, constituindo-se em alvo para investigações relacionadas a doenças parasitárias. Essas características

tornam *E. tuberculatum* um organismo promissor em pesquisas voltadas à descoberta de compostos com aplicação à saúde.

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *T. cruzi*, ainda representa um desafio significativo para a saúde pública, mesmo após décadas de esforços em prevenção e controle. Apesar da redução da transmissão vetorial em algumas regiões, milhões de pessoas permanecem infectadas e sob risco de desenvolver formas graves da doença, que pode afetar o coração, o sistema digestório e, conseqüentemente, a qualidade e a expectativa de vida. Esse cenário é agravado pela expansão geográfica da enfermidade para países não endêmicos, impulsionada por migração e globalização, o que amplia sua relevância no contexto da saúde internacional.

O tratamento disponível atualmente é limitado a dois fármacos principais, que apresentam maior eficácia na fase aguda e resposta insatisfatória na fase crônica. Além disso, os efeitos adversos associados ao uso dessas drogas comprometem a adesão ao tratamento, e há relatos de resistência do parasita. Esses fatores evidenciam a necessidade urgente de novos compostos, mais eficazes e menos tóxicos, capazes de atuar em diferentes estágios da infecção e reduzir o impacto da doença.

Desse modo, moléculas bioativas de origem animal vêm ganhando destaque como fonte de inovação farmacológica, e o veneno de formigas é reconhecido por conter peptídeos e proteínas com atividades biológicas relevantes. Entre essas espécies, *E. tuberculatum* se destaca pela diversidade e complexidade química de seu veneno, que inclui toxinas capazes de interagir com membranas celulares e potencialmente interferir em processos vitais de micro-organismos. Essa riqueza molecular abre caminho para a investigação de compostos com ação antiparasitária, oferecendo novas perspectivas para terapias contra protozoários de importância médica, como *T. cruzi*.

O uso da cepa Tulahuen no presente estudo reforça a aplicabilidade dos resultados, por se tratar de uma variante com alta capacidade de replicação em culturas celulares a torna adequada para ensaios experimentais que busquem avaliar a eficácia e o mecanismo de ação de novos compostos.

Portanto, o presente trabalho se justifica pela necessidade de ampliar o arsenal terapêutico contra a doença de Chagas, explorando uma fonte natural de moléculas bioativas ainda pouco investigada. Ao unir conhecimentos da parasitologia, da

toxicologia e da bioquímica, espera-se contribuir para a identificação de alternativas promissoras no tratamento de uma enfermidade que continua a impor importantes desafios médicos e sociais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do peptídeo isolado do veneno da formiga *E. tuberculatum* quanto à toxicidade em células LLCMK2 e ao desenvolvimento de *T. cruzi* cepa Tulahuen, investigando seu potencial como agente antiparasitário

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a viabilidade das células LLCMK2 após tratamento com diferentes concentrações do peptídeo, visando avaliar a citotoxicidade do composto.
- Analisar o efeito do peptídeo sobre a capacidade de invasão de *T. cruzi* nas células LLCMK2.
- Investigar a influência do peptídeo na multiplicação intracelular de *T. cruzi* em culturas de células LLCMK2.
- Comparar os resultados obtidos nos ensaios para identificar a concentração do peptídeo com maior impacto na interação de *T. cruzi* com células LLCMK2.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura Celular

Células da linhagem LLCMK2, de morfologia epitelial e originárias do rim de um macaco adulto, foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/high glucose – Cultilab) suplementado com penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

A manipulação das células foi realizada conforme a confluência obtida nas garrafas de cultivo. Para os repiques, as células foram lavadas com PBS, tratadas com solução de tripsina-EDTA 0,05% (Vitrocell) e ressuspensas em meio DMEM. Conforme ocorria a

multiplicação e expansão celular, foram realizados repiques para aumentar o número de garrafas de cultivo LLCMK2, garantindo a manutenção das culturas de *T. cruzi* e a execução dos ensaios experimentais.

4.2 Parasitos

Foram utilizadas formas evolutivas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Os parasitas foram mantidos em meio DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e cultivados em associação com células LLCMK2. O meio foi ajustado para pH entre 7,2 e 7,5. Os parasitas foram armazenados em garrafas de cultivo celular e mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

Os parasitas foram utilizados para a realização dos ensaios conforme a densidade adequada na cultura. As manipulações com as células LLCMK2 foram conduzidas de forma a favorecer a transição dos parasitas da forma amastigota para a forma tripomastigota, garantindo a predominância desta última nos experimentos.

4.3 Análise da Viabilidade Celular

O peptídeo empregado neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia, com a finalidade de avaliar seu potencial no contexto da Doença de Chagas. Para a análise da viabilidade celular, utilizou-se o método da resazurina, que se baseia na redução do corante azul, não fluorescente, à resorufina, de coloração rosa e fluorescente, realizada apenas por células metabolicamente ativas.

As células LLCMK2 foram semeadas em placas de 96 poços, em densidade previamente determinada, e mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂, por tempo suficiente para permitir sua adesão ao substrato. Foram estabelecidos controles experimentais, incluindo células não tratadas, utilizadas como referência de 100% de viabilidade, e células expostas ao Triton X-100, para representar a perda total de viabilidade. Controles adicionais, como o veículo do peptídeo e poços contendo apenas meio de cultura, foram utilizados para garantir a confiabilidade das leituras.

Após a aderência celular, o meio foi substituído e as culturas receberam diferentes concentrações do peptídeo, obtidas por diluição seriada a partir da solução-mãe. Seguiu-se novo período de incubação nas mesmas condições. Decorrido o tempo de exposição, adicionou-se solução de resazurina a cada poço, mantendo-se a incubação em ambiente

protegido da luz. A leitura da fluorescência foi realizada em equipamento específico para leitura de placa, registrando-se a intensidade nos comprimentos de onda de excitação e emissão apropriados.

4.4 Ensaio de Viabilidade em *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas da cepa Tulahuen foram obtidas a partir de culturas mantidas com células LLCMK2 e ajustadas a uma concentração padrão para o ensaio. Os parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços, expostos a diferentes concentrações do peptídeo e incubados sob as mesmas condições utilizadas para as células.

Foram incluídos controles negativos (parasitas sem tratamento) e positivos (parasitas expostos a agente letal). Ao término do período de incubação, adicionou-se solução de resazurina e as placas foram mantidas em ambiente protegido da luz até a leitura da fluorescência, utilizando os mesmos parâmetros empregados no ensaio celular. A viabilidade foi calculada em relação ao controle negativo.

4.5 Ensaio de Invasão

O ensaio de invasão foi conduzido utilizando formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TCT), previamente cultivadas em associação com células LLCMK2. Inicialmente, o sobrenadante proveniente das garrafas de cultivo contendo parasitas foi coletado e submetido a centrifugação diferencial. A primeira etapa consistiu na centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, a fim de sedimentar as células aderentes. Em seguida, os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos para permitir que os parasitas migrassem para o sobrenadante, o qual foi então transferido para novos tubos e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, visando a sedimentação dos tripomastigotas. O pellet obtido foi ressuscitado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a contagem dos parasitas em Câmara de Neubauer.

A concentração de parasitas necessária para o experimento foi determinada com base na razão de multiplicidade de infecção (MOI), definida entre 1:5 e 1:10, considerando a quantidade de células LLCMK2 previamente plaqueadas (4×10^4 células/poço). As quantidades de parasitas para cada condição experimental foram calculadas e ressuscitadas em volumes adequados de DMEM 10%, de acordo com os tratamentos previstos.

O peptídeo em estudo foi preparado por diluição seriada em microtubos estéreis, a partir de soluções-mãe em concentrações conhecidas. Os TCTs foram pré-tratados com as respectivas diluições do peptídeo por um período de 2 horas. Paralelamente, as células LLCMK2 foram também pré-tratadas com o peptídeo por igual período.

Após o pré-tratamento, os parasitas foram lavados por centrifugação (4000 rpm, 10 minutos) e ressuspensos em DMEM 10%. Em seguida, foram adicionados às placas contendo as células LLCMK2, nas concentrações previamente calculadas para cada condição experimental. As placas destinadas à invasão na presença de tratamento receberam simultaneamente o peptídeo e os parasitas. O período de invasão foi padronizado em 3 horas.

Finalizado o tempo de invasão, todos os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remover parasitas não internalizados. Em seguida, adicionou-se 75 µL de CPRG (clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo) a cada poço e procedeu-se à leitura da absorbância a 570 nm, de modo a quantificar a invasão parasitária.

4.6 Ensaio de Multiplicação

O ensaio de multiplicação foi realizado utilizando formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TCT) da cepa Tulahuen, previamente mantidas em cultura com células LLCMK2. O sobrenadante das garrafas de cultivo contendo parasitas foi reunido e submetido a centrifugação diferencial. Primeiramente, centrifugou-se a 1500 rpm por 10 minutos para sedimentar as células. Em seguida, os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos, permitindo que os parasitas migrassem para o sobrenadante. Este foi então transferido para novos tubos e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, visando o pellet dos tripomastigotas. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 50 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota de 10 µL da suspensão foi utilizada para a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer, considerando a diagonal do quadrante central.

A concentração de parasitas necessária foi calculada com base na multiplicidade de infecção (MOI) de 1:5, considerando-se 4×10^4 células LLCMK2 plaqueadas por poço. Para o preparo do tratamento, o peptídeo avaliado foi diluído em DMEM 10% a partir de soluções-mãe, obtendo-se três concentrações finais: Pep (7,5 µM, 60 µM e 960 µM). Inicialmente, o meio das placas foi removido e os poços designados para as condições 1 e 2 receberam 100 µL do peptídeo, seguido da adição de 100 µL da suspensão de

parasitas. As condições 3 e 4 receberam 200 μL de parasitas sem tratamento inicial. Após 3 horas de invasão, todos os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remover parasitas não internalizados, e as condições 2 e 4 receberam 200 μL de DMEM 10%.

As condições 1 e 3 foram tratadas novamente com o peptídeo, desta vez em concentrações ajustadas (Peptídeo: 7,5 μM , 60 μM e 960 μM), utilizando volumes de 200 μL por poço. O acompanhamento da multiplicação foi realizado em diferentes intervalos (24 h, 48 h, 72 h e 96 h). Em seguida, adicionaram-se 75 μL de CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo) e procedeu-se à leitura da absorbância a 570 nm, para quantificação da multiplicação parasitária.

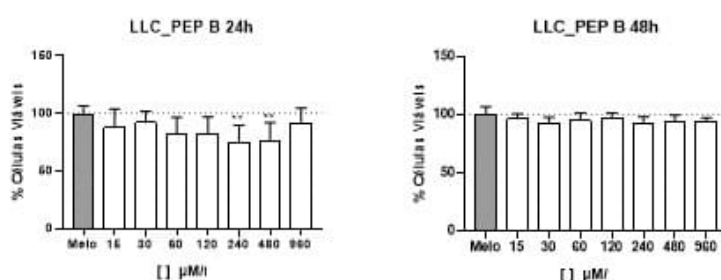
4.7 Análise Estatística

Os dados obtidos nos diferentes ensaios foram expressos como média \pm desvio padrão. Para aqueles que apresentaram distribuição normal, aplicou-se a análise de variância de uma via (One-way ANOVA), seguida de teste de múltiplas comparações. Nos casos em que os dados não atenderam aos critérios de normalidade, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, também acompanhado de comparações múltiplas. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade em células LLCMK2

A avaliação da toxicidade celular na linhagem LLCMK2 após tratamento com diferentes concentrações do Peptídeo B foi realizada nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h. Os resultados estão representados na Figura 2.



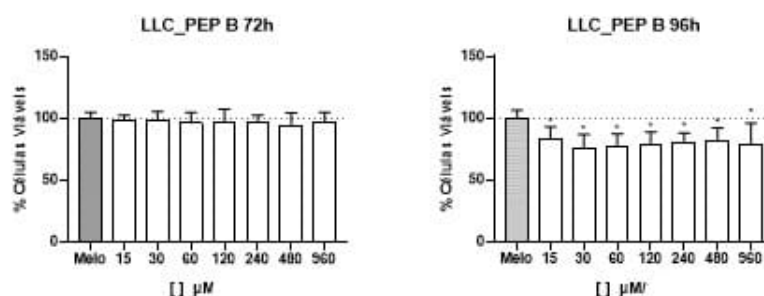


Figura 2. Avaliação da toxicidade em células LLCMK2 expostas ao Peptídeo B nas concentrações de 15 a 960 µM, avaliadas em 24h, 48h, 72h e 96h. Os valores estão expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (Meio).

Após 24h de exposição, observou-se que a maioria das concentrações testadas manteve valores de viabilidade semelhantes ao controle, com exceção de 240 µM e 480 µM, que apresentaram discreta redução no número de células viáveis. Em 48h, os valores permaneceram estáveis, sem alterações relevantes em comparação ao grupo controle em nenhuma das concentrações. As 72h, os valores de viabilidade se mantiveram próximos de 100% em todos os tratamentos. No tempo mais prolongado, de 96h, verificou-se redução da viabilidade celular em todas as concentrações analisadas, quando comparadas ao controle, embora os valores ainda tenham permanecido próximos da faixa considerada viável.

De forma geral, os resultados indicam que o Peptídeo B não apresentou toxicidade significativa, mas houve discreta diminuição em concentrações intermediárias no tempo de 24h e uma tendência de redução mais evidente em todas as concentrações após 96h de incubação.

5.2 Avaliação da toxicidade em *Trypanosoma cruzi*

No teste subsequente, foi avaliada a viabilidade das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) após a exposição ao Peptídeo B nas concentrações de 7,5 a 960 µM, nos tempos de 24h e 72h, conforme ilustrado na Figura 3.

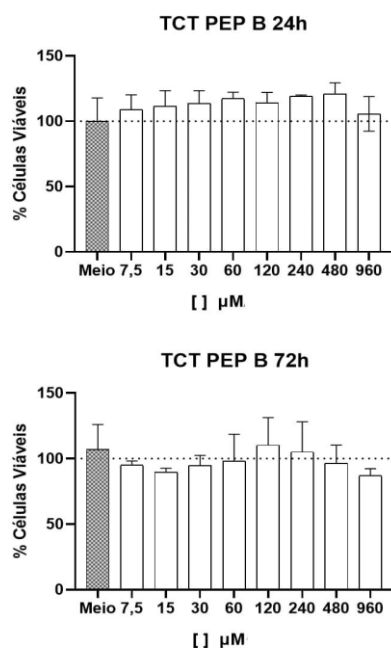


Figura 3. Avaliação da toxicidade nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen) tratadas com o Peptídeo B (7,5–960 µM) por 24h e 72h. Os valores estão expressos como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle (Meio).

No tempo de 24h, as concentrações de 7,5 a 480 µM mantiveram percentuais de viabilidade próximos ou ligeiramente superiores ao controle. Na concentração mais alta, 960 µM, verificou-se discreta redução, embora ainda dentro da faixa próxima ao valor basal, sem indícios de queda acentuada nesse período. Já no tempo de 72h, observou-se um comportamento distinto. As concentrações mais baixas (7,5; 15 e 30 µM) apresentaram valores inferiores ao controle, enquanto em 60 µM a viabilidade se manteve próxima de 100%. As concentrações intermediárias (120 e 240 µM) exibiram valores semelhantes ou discretamente superiores ao controle, acompanhados por maior variabilidade entre as repetições. Em 480 µM, os níveis permaneceram próximos ao grupo não tratado, ao passo que em 960 µM foi registrada a menor viabilidade do conjunto. Dessa forma, os resultados sugerem que, após 72h de incubação, houve redução mais evidente da viabilidade nas concentrações extremas, enquanto os valores se mantiveram estáveis nas concentrações intermediárias.

5.3 Ensaio de Invasão Celular

Para avaliar a capacidade de invasão de *T. cruzi* em células LLCMK2 foi realizada uma análise a partir de três condições experimentais distintas, conforme demonstrado na Figura 4.

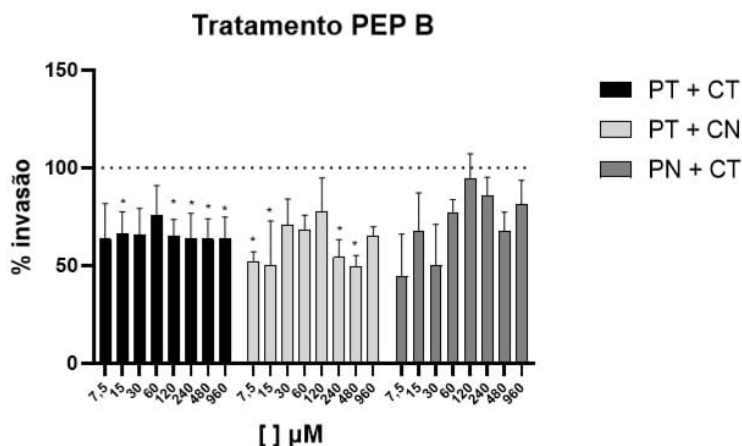


Figura 4. Porcentagem de invasão de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) em células LLCMK2 após tratamento com o Peptídeo B nas concentrações de 7,5 a 960 µM, considerando três condições experimentais: Parasita Tratado + Célula Tratada (PT + CT), Parasita Tratado + Célula Não Tratada (PT + CN) e Parasita Não Tratado + Célula Tratada (PN + CT). Os valores estão expressos em relação ao controle (100%). Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Dessa maneira, analisando as condições impostas é possível notar que quando tanto parasitas quanto células foram tratados simultaneamente (PT + CT), verificou-se queda consistente na taxa de invasão ao longo de todas as concentrações, ainda que com variações de intensidade entre elas. Na condição em que apenas os parasitas foram submetidos ao tratamento (PT + CN), a redução foi ainda mais evidente. Em concentrações baixas (7,5 e 15 µM) se observava queda acentuada, que se manteve em diferentes níveis ao longo das demais concentrações. Nas concentrações mais altas (480 e 960 µM), a invasão também permaneceu reduzida em relação ao controle. Entretanto, na condição em que apenas as células hospedeiras foram tratadas (PN + CT), os valores permaneceram mais próximos aos do grupo controle, com discreto aumento em algumas concentrações. Dessa forma, o tratamento isolado das células não promoveu uma redução tão expressiva na capacidade invasiva do parasita.

Na sequência, para avaliar a capacidade de invasão, foi realizado um ensaio em que o tratamento com o Peptídeo B era aplicado no momento da invasão. Assim, considerando o percentual de parasitas que conseguiram invadir em relação ao grupo controle (Meio). Os resultados estão representados na Figura 5.

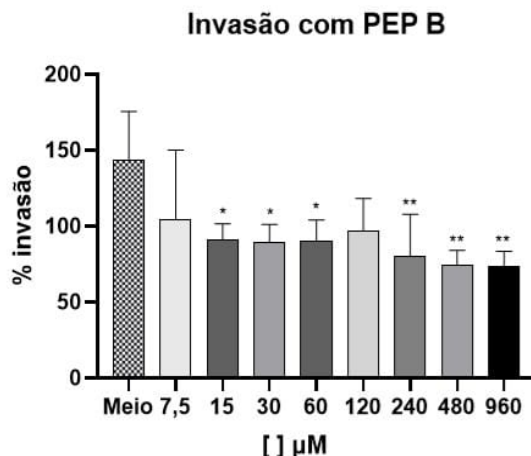


Figura 5. Porcentagem de invasão de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) em células LLCMK2 tratadas com diferentes concentrações do Peptídeo B (7,5 a 960 µM). Os valores estão expressos em relação ao controle (Meio). Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Nesta avaliação, observou-se que a exposição ao peptídeo resultou em diminuição progressiva da invasão. Em concentrações mais baixas (7,5; 15 e 30 µM), já se verificava redução significativa em comparação ao controle. O mesmo padrão foi mantido nas concentrações intermediárias (60 e 120 µM), com valores inferiores aos do grupo não tratado. Nas concentrações mais elevadas (240, 480 e 960 µM), o efeito inibitório foi ainda mais acentuado, registrando os menores percentuais de invasão do conjunto.

5.4 Ensaio de Multiplicação

Os resultados do ensaio de multiplicação do *T. cruzi* tratados com o Peptídeo B estão representados na Figura 6. A análise foi realizada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, avaliando diferentes concentrações do peptídeo (7,5; 60 e 960 µM) em comparação ao grupo controle (Meio).

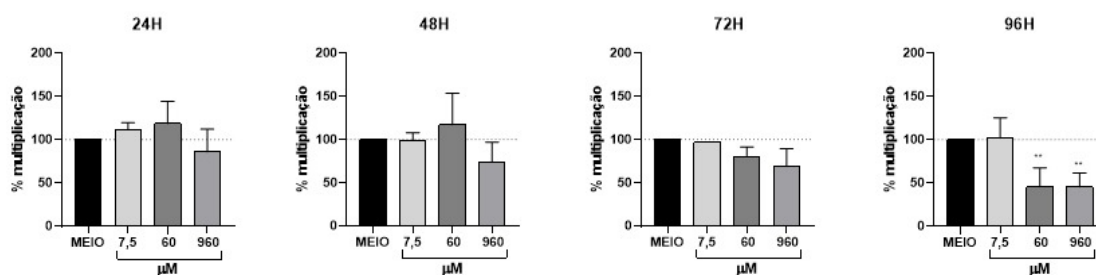


Figura 6. Efeito do Peptídeo B na multiplicação de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) em diferentes concentrações (7,5; 60 e 960 μ M), avaliados em 24h, 48h, 72h e 96h. Os valores estão expressos como percentual de multiplicação em relação ao grupo controle (Meio).

Observou-se que, nos tempos iniciais (24h e 48h), as concentrações testadas não promoveram alterações estatísticas significativas na taxa de multiplicação dos parasitos, apresentando valores próximos ao controle. No entanto, em 72h já foi possível identificar uma tendência de redução da multiplicação na concentração de 960 μ M, embora sem diferença expressiva em relação ao controle. Após 96h, a diminuição foi mais evidente, especialmente nas concentrações de 60 μ M e 960 μ M, que apresentaram queda significativa na taxa de multiplicação em comparação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório do Peptídeo B sobre a multiplicação de *T. cruzi* é dependente tanto da concentração quanto do tempo de exposição.

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas permanece classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma enfermidade tropical negligenciada, afetando milhões de pessoas em todo o mundo e ainda associada a elevada morbimortalidade (WHO, 2025). Embora avanços no controle vetorial tenham reduzido a incidência em algumas regiões, as opções terapêuticas continuam restritas e apresentam eficácia limitada, especialmente na fase crônica, além de efeitos adversos que comprometem a adesão ao tratamento (Pérez-Molina; Molina, 2018). Nesse contexto, a busca por novas moléculas com ação antiparasitária é urgente. Logo, os resultados obtidos neste estudo reforçam essa necessidade, uma vez que o Peptídeo B, derivado do veneno da formiga *E. tuberculatum*, demonstrou interferir seletivamente na interação do *T. cruzi* com células hospedeiras, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas.

Os ensaios realizados mostraram que o peptídeo B reduziu de maneira significativa tanto a capacidade de invasão quanto a multiplicação intracelular do *T. cruzi*, sem causar efeito citotóxico relevante sobre células LLCMK2 e nem sobre os parasitas nas condições avaliadas. Portanto, isso indica que a ação do composto não está relacionada à toxicidade direta, mas sim a uma interferência em mecanismos específicos da interação parasita-hospedeiro.

O processo de invasão do *T. cruzi* depende de glicoproteínas de superfície cuja expressão varia de acordo com a forma evolutiva do parasita. Os tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs), utilizados no presente estudo, apresentam as proteínas da família Tc85, pertencentes ao grupo GP85, como as predominantes. Estas se ligam a componentes da matriz extracelular, como laminina e fibronectina, favorecendo a penetração nas células (Alves; Colli, 2007). Além disso, trans-sialidases e mucinas ancoradas por GPI estão abundantemente presentes na superfície dos TCTs e desempenham papéis na adesão, na evasão imune e na manutenção da infecção (Buscaglia *et al.*, 2006; Di Noia *et al.*, 1998). Dessa forma, o efeito mais evidente do Peptídeo B quando aplicado previamente aos parasitas pode estar associado à desorganização ou ao bloqueio funcional dessas glicoproteínas de superfície, em especial da família Tc85, prejudicando sua interação com as células hospedeiras. Essa hipótese é coerente com os resultados obtidos, que mostraram inibição significativa da invasão mesmo em concentrações baixas do peptídeo.

Outra hipótese sobre os resultados é o papel das vesículas extracelulares liberadas pelo *T. cruzi*, conhecidas por transportar moléculas como trans-sialidases, mucinas e outros fatores que aumentam a infectividade e modulam a resposta imune do hospedeiro. Essas vesículas funcionam como importantes mediadores da comunicação paracrina entre parasitas e células, favorecendo a instalação da infecção (Cestari *et al.*, 2012; Torrecilhas *et al.*, 2016). Assim, é plausível sugerir que o Peptídeo B interfira na liberação ou na funcionalidade dessas vesículas, limitando a eficiência da invasão.

Já no ensaio de multiplicação, observou-se que concentrações mais elevadas e tempos prolongados de exposição ao peptídeo resultaram em inibição significativa da replicação do parasita. Uma hipótese para esse efeito é que o peptídeo B comprometa o escape do tripomastigota do vacúolo parasitóforo, etapa essencial para a diferenciação em amastigotas e posterior multiplicação. Alternativamente, a interação do peptídeo com membranas do parasita pode afetar organelas-chave, como mitocôndrias ou reservossomos, interferindo em processos metabólicos indispensáveis à replicação intracelular, mesmo que sem causar lise imediata.

Embora os resultados obtidos sejam encorajadores, este estudo apresenta algumas limitações metodológicas. A ausência de análises morfológicas mais detalhadas, como microscopia de fluorescência ou eletrônica, impede esclarecer se o peptídeo atua diretamente na membrana do parasito ou em componentes intracelulares da célula hospedeira. Da mesma forma, não foram realizados ensaios específicos de ligação que

confirmem a interação do composto com glicoproteínas de superfície do *T. cruzi*. Considerando ainda a relevância das vesículas extracelulares na modulação da infectividade, torna-se necessário investigar se o peptídeo interfere nesse processo. Nesse sentido, estudos futuros devem contemplar análises de biologia celular e molecular, incluindo ensaios de ligação a proteínas de superfície, avaliação da dinâmica vacuolar e caracterização do perfil de vesículas extracelulares, além de ensaios *in vivo* para validar o potencial farmacológico do composto.

Em conjunto, os achados sugerem que o Peptídeo B não exerce ação citotóxica indiscriminada, mas atua como modulador seletivo da interação entre *T. cruzi* e células hospedeiras. Essa modulação pode estar associada à interferência em glicoproteínas características dos tripomastigotas de cultura de tecido, como Tc85, trans-sialidases e mucinas, bem como em mecanismos de invasão dependentes de cálcio e da liberação de vesículas extracelulares. Assim, este estudo contribui para ampliar a compreensão sobre os mecanismos de ação de moléculas bioativas derivadas de venenos animais e reforça o potencial dessas substâncias como candidatas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a Doença de Chagas.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o peptídeo derivado do veneno de *E. tuberculatum* apresenta potencial atividade frente ao *T. cruzi* em modelo *in vitro*. De maneira geral, os ensaios realizados indicaram que o composto interfere na viabilidade do parasito e na sua interação com células hospedeiras, sugerindo um possível efeito antiparasitário. Esses resultados reforçam a importância da investigação de moléculas bioativas provenientes de venenos de insetos como fontes alternativas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a Doença de Chagas. No entanto, a validação desse potencial requer pesquisas futuras, que incluam testes de seletividade, análises em modelos animais e a caracterização detalhada dos mecanismos de ação envolvidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. **Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures.** Subcellular Biochemistry, v. 47, p. 58–69, 2007. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_4

ARANTES, E. C. **Assessing the Proteomic Activity of the Venom of the Ant *Ectatomma tuberculatum***. *Toxins*, v. 10, n. 11, p. 1-19, 2018. DOI: 10.3390/toxins10110449.

BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. **Clinical course of chagas' heart disease: A comparison with dilated cardiomyopathy**. *International Journal of Cardiology*, v. 60, n. 2, p. 187–193, 25 jun. 1997. DOI: 10.1016/S0167-5273(97)00083-1

BERNABÓ, G. et al. **Gp82 and Gp90 released in extracellular vesicles regulate *Trypanosoma cruzi* infectivity**. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 747379, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.747379>

BILATE, A.M.; CUNHA-NETO, E. **Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, p. 67-74, 2008.

BUSCAGLIA, C. A. et al. **Surface mucins of *Trypanosoma cruzi*: host–parasite interactions and immunomodulation**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 149, p. 1–9, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.003>

CHADALAWADA, Sindhu et al. **Risk of Chronic Cardiomyopathy Among Patients With the Acute Phase or Indeterminate Form of Chagas Disease: A Systematic Review and Metaanalysis**. *JAMA Network Open*, [S. l.], v. 3, n. 8, p. e2015072, 2020. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.15072>

CESTARI, I.; ANTONIAZZI, M. M.; RAMIREZ, M. I. ***Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles**. *Journal of Immunology*, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>

DE SOUZA, W. **Cell Biology of *Trypanosoma cruzi***. *International Review of Cytology*, v. 86, n. C, p. 197–283, 1 jan. 1984. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)60180-1.

DE SOUZA, W. **O parasito e sua interação com os hospedeiros**. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DIAS, J. C. P. **Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p. 370–375, 2006. DOI: 10.1590/S0037-86822006000400010

DI NOIA, J. M. et al. **High diversity in mucin genes and mucin proteins in *Trypanosoma cruzi***. Journal of Biological Chemistry, v. 273, p. 10843–10850, 1998. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10843>

ECHAVARRÍA, Natalia Giraldo; ECHEVERRÍA, Luis E.; STEWART, Merrill; GALLEGÓ, Catalina; SALDARRIAGA, Clara. **Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. Current Problems in Cardiology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 100507, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>

HERNÁNDEZ-OSORIO, L.A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R.G. **Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms**. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 10, p.1- 10, 2010.

JILL M C HAKIM, SNEIDER A GUTIERREZ GUARNIZO, EDITH MÁLAGA MACHACA, ROBERT H GILMAN, MONICA R MUGNIER, **Whole-genome assembly of a hybrid *Trypanosoma cruzi* strain assembled with Nanopore sequencing alone, *G3 Genes|Genomes|Genetics***, Volume 14, Issue 6, June 2024, jkae076, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkae076>

LIU, ZONGYUAN; ULRICH VONBARGEN, REBECCA; MCCALL, LAURA ISOBEL. **Central role of metabolism in *Trypanosoma cruzi* tropism and Chagas disease pathogenesis. Current opinion in microbiology**, [S. l.], v. 63, p. 204–209, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.07.015>

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.. **Differential enzyme activity and oxidative stress response in Tulahuen 2 vs Y strain. *Acta Tropica***, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.12.001>

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; FERNANDES, M.C.; DA SILVA, C.V.; FERNANDES, A.B.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. **Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry**. Sub-cellular Biochemistry, v. 47, p. 101-109, 2008.

MORETTI, NILMAR SILVIO; MORTARA, RENATO ARRUDA; SCHENKMAN, SERGIO. ***Trypanosoma cruzi*. Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 404–405, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>.

MURTA, Silvano M. F. **Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi***. Molecular and biochemical

parasitology, [S. l.], v. 146, n. 2, p. 151–162, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.001>

NORMAN, FRANCESCA F.; LÓPEZ-VÉLEZ, ROGELIO. **Chagas disease: Comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management**. Journal of Travel Medicine, [S. l.], v. 26, n. 7, 2019. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz060>

OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Doença de Chagas**. Brasília: OPAS, 2016. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/doenca-chagas>.

OSTWALD, M. M.; RUZI, S. A.; BAUDIER, K. M. **Ambush predation of stingless bees (*Tetragonisca angustula*) by the solitary-foraging ant *Ectatomma tuberculatum***. Journal of Insect Behavior, v. 31, p. 503–509, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10905-018-9694-9>.

RASSI, A.; RASSI JR, A. DOENÇA DE CHAGAS. IN: AMATO NETO, V.; GRYSCHKE, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 127-138.

ROCHA, Ivonete Helena; FERREIRA MARQUES, Ana Luisa; MORAES, Giselle Vanessa; ALVES DA SILVA, Djalma Alexandre; SILVA, Marcos Vinicius Da; RODRIGUES, Virmondes; CUNHA, Daniel Ferreira Da; CORREIA, Dalmo. **Metabolic and immunological evaluation of patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas disease**. Medicine, [S. l.], v. 99, n. 51, p. e23773, 2020. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023773>

PÉREZ-MOLINA JA, MOLINA I. **Chagas disease**. Lancet. 2018 Jan 6;391(10115):82-94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28673423.

SHILOV, E. S. et al. **Recombinant proteins containing amino acid sequences of two ectatomin chains**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 7, n. 1, p. 115-120, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(96\)00574-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(96)00574-1)

SYKES ML, KENNEDY EK, AVERY VM. **Impact of Laboratory-Adapted Intracellular *Trypanosoma cruzi* Strains on the Activity Profiles of Compounds with Anti-*T. cruzi* Activity**. Microorganisms. 2023 Feb 14;11(2):476. doi: 10.3390/microorganisms11020476. PMID: 36838441; PMCID: PMC9967867.

TEIXEIRA, A.R.; HECHT, M.M.; GUIMARO, M.C.; SOUSA, A.O.; NITZ, N. **Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity**. Clinical Microbiology Reviews, v. 24, p. 592-630, 2011.

TORRECILHAS, A. C. et al. **Extracellular vesicles in *Trypanosoma cruzi* infection: host–parasite communication**. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, p. 161, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00161>

VILLARREAL, D.; NIRDÉ, P.; HIDE, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. **Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 2701-2709, 2009.

WIKIPEDIA. *Ectatomma tuberculatum*. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Ectatomma_tuberculatum.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

ZUMA, Aline A.; DOS SANTOS BARRIAS, Emile; DE SOUZA, Wanderley. **Basic Biology of *Trypanosoma cruzi***. *Current Pharmaceutical Design*, [S. l.], v. 27, n. 14, p. 1671–1732, 2020. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>