



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

TICIANA PRACIANO PEREIRA

EFEITO TRIPANOCIDA DA L-AMINO ÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO
DA *Bothrops marajoensis*

FORTALEZA

2015

TICIANA PRACIANO PEREIRA

EFEITO TRIPANOCIDA DA L-AMINO ÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA
Bothrops marajoensis

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dra. Alice Maria C. Martins

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P489e Pereira, Ticiana Praciano.

Efeito tripanocida da l-amino ácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis*
Ticiana Praciano Pereira. – 2015.

81 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Biologia para a Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. L-aminoacido Oxidase. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Doença de Chagas. I. Título.

CDD 615.942

TICIANA PRACIANO PEREIRA

EFEITO TRIPANOCIDA DA L-AMINO ÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA
Bothrops marajoensis

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas. Área de concentração:
Biologia para a Saúde.

Aprovada em : ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Alice Maria C. Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^o Dr. Gandhi Rádís Batista (Examinador)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a Dra. Maria de Fátima Oliveira (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Andrezza Raposo Borges (Examinadora)
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ / PE)

Prof^o Dr. Ricardo Pires dos Santos (Examinador)
Universidade Federal do Ceará

À minha amada família, principalmente à mãezinha, que não mediu esforços em nos educar e me incentiva todos os dias a crescer profissionalmente e não temer às dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e ilumina meus dias para que eu possa atingir os meus objetivos.

Às minhas irmãs, Vanessa e Eulani e ao meu pai e minha mãe, que acompanharam e torceram por esta minha realização.

À professora Alice, que aceitou ser minha orientadora por mais esta etapa e acreditou e confiou em meu trabalho.

Aos professores que colaboraram em algum momento desse trabalho: prof^o Gandhi, prof^a M^a de Fátima e prof^a Julia Manso

Agradeço a colaboração da professora e pesquisadora do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/ PE), Dra. Regina Figueiredo Bressan, que permitiu a realização dos ensaios de microscopia eletrônica e na realização do artigo científico do conteúdo desse trabalho sempre muito atenciosa. Além da Dra. Andreza que realizou os ensaios de microscopia.

À minha grande amiga/irmã Elfie Figueiredo que acompanhou e me incentivou nesse processo.

Agradeço à querida amiga/irmã e parceira de profissão, Suzana Barbosa. Juntas, nas aflições e nas conquistas, caminhamos e vencemos mais essa etapa.

Aos demais amigos da pós graduação que acompanharam e me ajudaram nesses longos e trabalhosos anos: Alba Fabíola, Andrea Bessa, Clarissa Mello, Izabel Cristina e Louise Tessarollo. E aos demais colegas do Laboratório de Cultivo Celular, obrigada pela parceria!

Esse trabalho teve o auxílio financeiro da CAPES e FUNCAP.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

RESUMO

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, continua a ser um problema de saúde pública nas Américas. No presente estudo, foram avaliados os efeitos da L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBmar) sobre todas as formas evolutivas do *T. cruzi*. Formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT, a 28°C na presença de LAAOBmar por 48 e 72 horas. Tripomastigotas foram obtidas a partir dos sobrenadantes de células LLC-MK₂ infectadas, ressuspensos em meio MEM com 2% de SBF e tratados durante 24 h. LAAOBmar mostrou uma atividade significativa contra epimastigotas (CI₅₀ 48h = 6,31µg/mL; CI₅₀ 72 h = 5,85µg/ml) e tripomastigotas (CL₅₀ 24h = 0,17µg/mL) e diminuiu a sobrevivência das formas amastigotas em células LLC-MK₂. A análise do possível envolvimento do peróxido de hidrogênio foi realizada por adição de catalase no meio, uma enzima que atua como retirador de H₂O₂. A morte celular mostrou que o efeito citotóxico da LAAOBmar é reduzido, mas não completamente abolido pela presença da catalase. A análise por microscopia confocal de epimastigota tratadas com LAAOBmar mostrou marcação com iodeto de propídio (IP), indicativo de perda de integridade da membrana, e perda do potencial de membrana mitocondrial, observado pela marcação de células tratadas com rodamina 123 (Rod123). Além disso, os ensaios de citometria de fluxo com anexina V e iodeto de propídio sugerem diminuição da permeabilidade da membrana plasmática. A análise ultraestrutural de epimastigotas e tripomastigotas, mostrou alterações morfológicas drásticas na mitocôndria com a desorganização da rede de kDNA rompido. O aumento de perfis de retículo endoplasmático, aumento da eletrondensidade da membrana mitocondrial, a perda da organização interna do parasita com inchaço do corpo celular e aparecimento de organelas alteradas, formação de estruturas de *mielina-like* indicativo de atividade autofágica, também foram observados nos parasitas tratados. Em conclusão, o LAAOBmar mostrou efeitos citotóxicos em *T. cruzi* e esta ação é apenas parcialmente dependente da produção de H₂O₂ pela LAAOBmar. Além disso, LAAOBmar induziu alterações morfológicas e fisiológicas compatíveis com perda de viabilidade e morte celular.

Palavras-chaves: L-aminoácido oxidase, *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, remains a public health problem in the Americas. In the present study, we evaluated the effects of L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* venom (BmLAAO) on the all evolutive forms of *T. cruzi*. Epimastigote forms of *T. cruzi*, were cultivated in LIT medium, at 28°C in BmLAAO presence for 48 and 72h. Trypomastigote were obtained from the supernatants of infected LLC-MK₂ cells, resuspended in MEM with 2% FBS and treated for 24 h. BmLAAO showed significant activity against the epimastigote (IC₅₀ 48h = 6.31µg/mL; IC₅₀ 72h = 5,85µg µg/mL.) and trypomastigote (LC₅₀ 24h= 0.17µg/mL) forms and decrease the amastigote survival within LLC-MK₂. Analysis of the possible involvement of hydrogen peroxide was performed by catalase addition in medium, an enzyme that acts as H₂O₂ scavenger. The cell death showed that the cytotoxic effect of BmLAAO is reduced but not completely abolished by the catalase presence. Confocal microscopy analysis of epimastigotes treated with BmLAAO showed staining with propidium iodide (PI), indicative of loss of membrane integrity, and loss of mitochondrial membrane potential, as observed by staining of treated cells with Rhodamine 123 (Rho123). Besides, the flow cytometry with annexin V and propidium iodide suggest decrease of membrane permeability. Ultrastructural analysis showed drastic morphological changes on the parasite mitochondrion with ruptured kDNA network. Increase of endoplasmic reticulum profiles, enhanced electrondensity of mitochondrion and endoplasmic reticulum membranes, loss of the parasite inner organization, swelling of cell body with the appearance of dismantling organelles, formation of myelin-like structures indicative of autophagic activity, were also observed in treated parasites. In conclusion, the BmLAAO showed cytotoxic effects on *T. cruzi* and this action is only partially dependent on H₂O₂ production by the BmLAAO. In addition, BmLAAO induced morphological and physiological alterations compatible with loss of viability and cell death.

Keywords: L-amino acid oxidase, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição global dos casos de Doença de Chagas 2006-2010.....	14
Figura 2 -	Evolução da área de distribuição do <i>T. infestans</i> no Brasil.....	16
Figura 3 -	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 4 -	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 5 -	Diagrama ultraestrutural da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	21
Figura 6 -	Fases da infecção do <i>Trypanosoma cruzi</i> na Doença de Chagas.....	25
Figura 7 -	Estruturas químicas dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox.....	26
Figura 8 -	Rapresentação sistemática da reação química catalisada pela L-aminoácido oxidase (LAAO).....	30
Figura 9 -	Atividade enzimática da L-aminoácido oxidase do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBmar).....	40
Figura 10 -	Curva de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> durante 12 dias de cultivo.....	41
Figura 11 -	Efeito citotóxico da LAAOBmar associada ou não a catalase sobre a forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> após 48 h (A) e 72 h (B) de tratamento.....	43
Figura 12 -	Efeito citotóxico do benzonidazol sobre a forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> após 48 h (A) e 72 h (B) de tratamento.....	44
Figura 13 -	Efeito citotóxico da LAAOBmar associada ou não a catalase sobre a forma tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 h de tratamento.....	47
Figura 14 -	Efeito citotóxico do benzonidazol sobre a forma tripomastigotasa de <i>T. cruzi</i> após 24 h de tratamento.....	47
Figura 15 -	Fotomicrografia de células LLC-MK ₂ infectada com amastigotas de <i>T. cruzi</i> a partir da infecção com tripomastigota no segundo dia (A) e terceiro dia de infecção (B).....	49
Figura 16 -	Efeito citotóxico da LAAOBmar sobre a linhagem celular LLC-MK ₂ após 24 h de tratamento.....	50
Figura 17 -	Efeito da LAAOBmar em células LLC-MK ₂ infectadas com amastigotas.....	51
Figura 18 -	Efeito da LAAOBmar sobre amastigotas.....	52
Figura 19 -	Efeito da LAAOBmar sobre a sobrevivência dos amastigotas.....	52

Figura 20 -	Fotomicrografia de células LLCM-K ₂ infectadas com formas amastigotas de <i>T.cruzi</i> tratadas ou não com LAAOBmar.....	53
Figura 21 -	Efeito da LAAOBmar na ultraestrutura de epimastigotas de <i>T.cruzi</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão.....	55
Figura 22 -	Efeito da LAAOBmar na ultraestrutura de tripomastigotas analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	56
Figura 23 -	Efeito da LAAOBmar na presença ou ausência da catalase (CAT, 100 µg/mL) em epimastigotas.....	58
Figura 24 -	Efeito da LAAOBmar sobre a integridade da membrana de epimastigotas analisado por microscopia confocal.....	60
Figura 25 -	Efeito da LAAOBmar sobre o potencial da membrana mitocondrial de epimastigotas analisado por microscopia de confocal.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Casos de doenças de Chagas aguda no Brasil por Regiões 2008-2013.....	15
Tabela 2 -	Principais formas de transmissão da Doença de Chagas aguda no Brasil por regiões (2010-2013).....	18
Tabela 3 -	Produtos elaborados a partir de toxinas de venenos de serpentes.....	29
Tabela 4-	Valores de CI_{50} da LAAOBmar e do Benzonidazol com seus respectivos tempos de incubação em culturas de epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Tabela 5 -	Percentuais de inibição de crescimento das formas epimastigotas tratados com LAAOBmar ou LAAOBmar + CAT após 48 horas de incubação.....	45
Tabela 6 -	Percentuais de inibição de crescimento das formas epimastigotas tratados com LAAOBmar ou LAAOBmar + CAT após 72 horas de incubação.....	46
Tabela 7 -	Valores de CL_{50} da LAAOBmar e Benzonidazol após 24 h de tratamento em culturas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
Tabela 8 -	Percentuais de viabilidade celular das formas tratadas com LAAOBmar ou LAAOBmar + CAT após 24 horas de incubação.....	48
Tabela 9 -	Percentual de eventos positivos após a marcação com iodeto de propídio (IP) e anexina V- FITC (AX), analisados por citometria de fluxo.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Doença de Chagas: Aspectos Epidemiológicos.....	13
1.2 Vias de Transmissão da doença de Chagas.....	15
1.2.1. Transmissão Vetorial.....	15
1.2.2 Transmissão por Transfusão sanguínea.....	17
1.2.3 Transmissão por Vias alternativas.....	17
1.3 O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.4 Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.4.1 Membrana plasmática.....	21
1.4.2 Flagelo.....	22
1.4.3. Mitocôndria e Cinetoplasto.....	22
1.4.4. Reservossomos.....	22
1.4.5 Glicossomos e acidocalcisomas.....	23
1.4.6 Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático.....	23
1.4.7 Núcleo.....	23
1.5 Evoluções clínica da doença de Chagas.....	24
1.6 Farmacoterapia da doença de Chagas.....	25
1.7 Venenos de serpentes como moléculas Bioativas.....	27
1.7.1 L-aminoácido oxidase.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Amostras.....	34
4.2 Atividade enzimática LAAOBmar.....	34
4.3. Cultivos de parasitas e de células de mamíferos.....	35
4.4 Avaliação da atividade da LAAOBmar sobre as formas epimastigota e tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	35
4.4.1 Envolvimento do peróxido de hidrogênio no mecanismo de morte celular.....	36
4.5 Padronização da infecção das células LLC-MK ₂ com formas tripomastigotas.....	36

4. 6 Avaliação da toxicidade da LAAOBmar em células de mamíferos LLC-MK ₂	37
4. 7 Avaliação do efeito da LAAOBmar sobre as formas amastigotas intracelulares.....	37
4. 8 Análises ultraestruturais por Microscopia eletrônica de Transmissão (MET).....	38
4. 9 Efeito da LAAOBmar analisado por citometria de fluxo.....	39
4. 10 Efeito da LAAOBmar analisado por microscopia confocal	39
4. 11 Análises estatísticas.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5. 1 Ensaio de determinação da atividade enzimática da LAAOBmar.....	40
5.2 <i>Avaliação da atividade da LAAOBmar sobre as formas epimastigotas e tripomastigota de T.cruzi.....</i>	<i>41</i>
5.2.1 <i>Curva de crescimento das formas epimastigotas.....</i>	<i>41</i>
5.2.2 <i>Efeito na inibição da replicação das formas epimastigotas.....</i>	<i>42</i>
5.2.3 <i>Efeito sobre a viabilidade das formas tripomastigotas.....</i>	<i>46</i>
5. 3 Padronização da infecção de células LLC-MK ₂ com a forma tripomastigota.....	48
5. 4 Avaliação da toxicidade da LAAOBmar sobre as células de mamíferos LLC-MK ₂ .	50
5. 5 Avaliação da atividade da LAAOBmar em amastigota.....	51
5. 6 Avaliações ultraestruturais de <i>T. cruzi</i> após o tratamento com LAAOBmar.....	54
5. 7 Efeito da LAAOBmar na integridade da membrana e no potencial apoptótico em epimastigotas analisados por citometria de fluxo.....	57
5. 8 Efeito da LAAOBmar sobre a integridade da membrana e da mitocôndria de epimastigota analisados por microscopia de confocal	58
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas: Aspectos Epidemiológicos

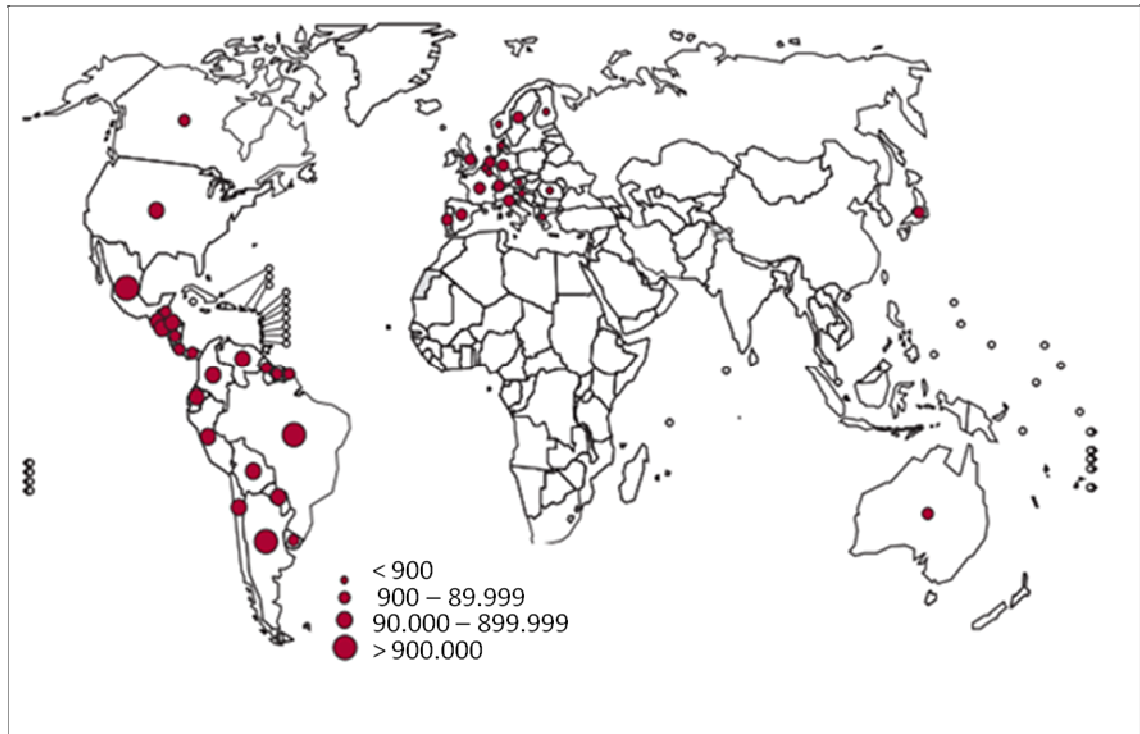
Descrita em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, a doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é um problema de saúde pública nos países subdesenvolvidos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO) a doença de Chagas faz parte do grupo de 17 doenças denominadas como Doenças Tropicais Negligenciáveis, as quais prejudicam o desenvolvimento sócio econômico das populações pobres (WHO, 2014).

Além de causar impacto na Saúde Pública desses países, a doença de Chagas gera também custos substanciais. Na Colômbia, por exemplo, o custo de cuidados médicos para os pacientes acometidos com a doença, foi em torno de 267 milhões de dólares somente em 2008. Além disso, os custos com inseticidas para o controle dos vetores, custam aproximadamente 5 milhões de dólares por ano (WHO, 2014).

Segundo os últimos dados epidemiológicos sobre a doença, cerca de 7 a 8 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo, com aproximadamente 10.000 mortes por ano (Rassi Jr *et al.*, 2010; WHO, 2014). O vetor triatomíneo responsável pela transmissão é predominantemente residente das Américas. Dessa forma, a América Latina possui a maior concentração de caso sendo identificadas 21 áreas endêmicas que englobam: Argentina, Belize, Bolívia, Venezuela, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Uruguai (WHO, 2014).

Devido a ocorrência de migrações para as áreas não endêmicas, a presença da doença de Chagas em países da América do Norte, Japão e Europa vêm gerando preocupação aos setores de saúde pública (Gascon *et al.*, 2010; Schmunis e Yadon, 2010). A prevalência nesses países depende principalmente da proporção de imigrantes oriundos das áreas endêmicas (Ortí- Lucas *et al.*, 2014), bem como do país de origem desses indivíduos. Desta forma, os Estados Unidos reúnem o maior número de casos da doença fora da América Latina, devido ao fato do grande contingente de imigrantes que o País recebe, principalmente provenientes do México. Cerca de 300.000 indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas habitam nos Estados Unidos e 80.000 na Europa conforme observado na FIGURA 1 (Bern e Montgomery, 2009; Martins *et al.*, 2012).

Figura 1: Distribuição global dos casos de doença de Chagas 2006-2010.



Fonte: WHO, 2014

No Brasil, predominam os casos crônicos com 2-3 milhões de infectados, sendo que anualmente ocorrem aproximadamente 6 mil mortes (Dias, 2007; Martins-Melo *et al.*, 2012). Porém, notificações nos órgãos de vigilância, indicam que nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda tem sido observada em diferentes estados do País, em especial na região Norte, seguida pela região Nordeste. De acordo com a TABELA 1 foram registrados entre os anos de 2011 a 2013, 601 novos casos de Doença de Chagas aguda no Brasil.

O Nordeste brasileiro se apresenta historicamente como região importante no mapa da transmissão da Doença de Chagas. Nos inquéritos nacionais de prevalência e distribuição realizados entre 1975 e 1980 a região Nordeste ocupava o segundo lugar em número de infectados e índices de infestação do triatomíneo (Dias *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Casos de doenças de Chagas aguda no Brasil.

Ano	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	C.Oeste	Total
2008	1	0	0	0	0	1
2009	26	0	0	0	1	27
2010	46	0	0	0	0	46
2011	258	25	1	0	12	296
2012	168	1	2	1	0	172
2013	124	5	3	1	0	133
Total	623	31	6	2	13	675

Fonte: BRASIL, 2014a.

1.2 Vias de Transmissão da Doença de Chagas

1.2.1. Transmissão Vetorial

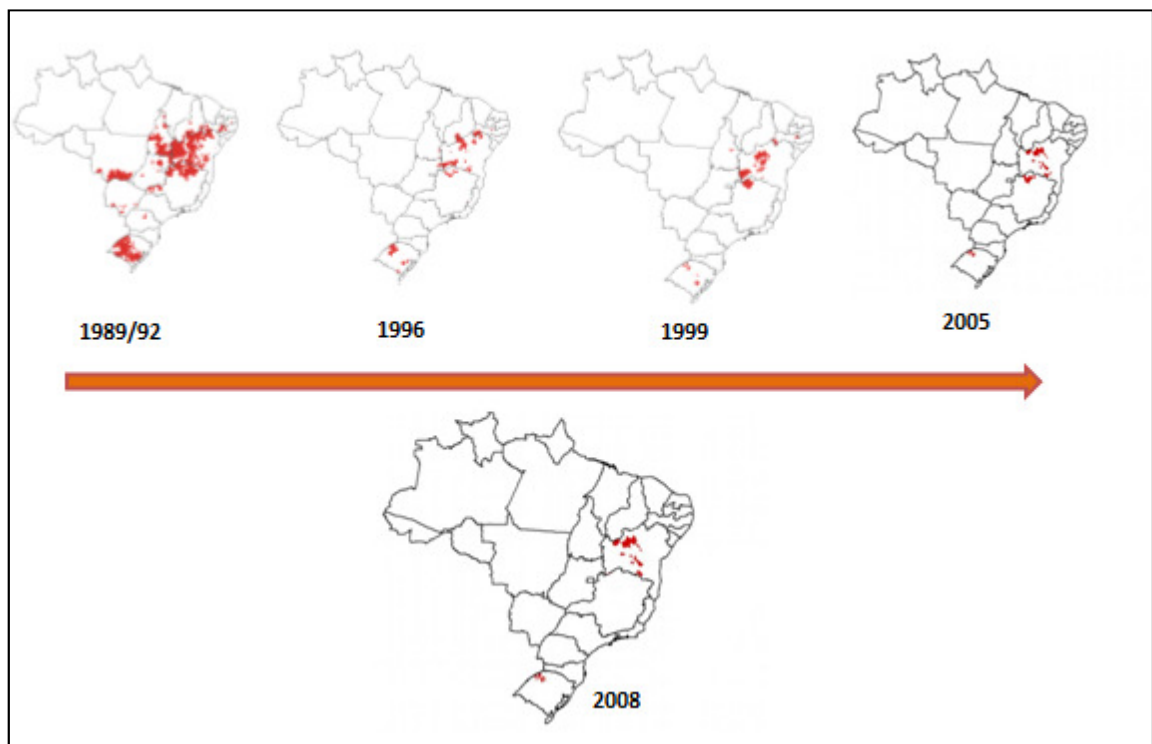
Por muitas décadas a doença de Chagas foi estritamente rural. Entretanto, com as mudanças socioeconômicas e a intervenção do homem nessas áreas, o perfil de transmissão da doença tem sido transformado.

A principal fonte de transmissão do parasita *Trypanosoma cruzi* é pela via vetorial, que ocorre através do triatomíneo hematófago, inseto conhecido popularmente como barbeiro. O vetor envolvido é agrupado em três principais gêneros (*Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*) e em cinco principais espécies com seguinte distribuição geográfica: *Triatoma infestans* é encontrado normalmente no sudeste da América do Sul; *Rhodnius prolixus* no norte da América do Sul e América Central; *Triatoma dimidiatus* América do Sul e Central e México; *Panstrongylus megistus* na região do sudoeste dos Estados Unidos e central da Argentina, Brasil e Paraguai e *Triatoma brasiliensis* no Brasil (Galvão *et al.*, 2003).

Estes insetos de hábitos noturnos vivem tipicamente nas frestas das casas de pau-a-pique, ninhos de pássaros, tocas de animais, casca de troncos de árvores e embaixo de pedras. No Brasil, os estados originalmente de risco para a transmissão vetorial são: AL, BA, CE, DF, GO, MA, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RN, RS, SE, SP, TO. As ações nesses territórios visam detectar a presença e prevenir a formação de colônias domiciliares do vetor. Enquanto na região da Amazônia Legal (AC, AM, AP, RO, RR, PA, parte do TO, MA e do MT), a vigilância é centrada na detecção precoce de casos agudos e surtos devido às novas ocorrências por transmissão oral e vetorial (sem colonização e extradomiciliar) (BRASIL, 2009a).

Nas décadas de 40 e 50 foram priorizadas as ações químicas utilizando inseticidas contra o vetor domiciliar juntamente com programas de melhoria habitacional e condições sanitárias, dessa forma, ocorreu gradativamente a redução da infecção pelo *Triatoma infestans*, vetor estritamente domiciliar no País. Em 2006, o Brasil recebeu a certificação internacional de controle da transmissão da doença pelo principal *T. infestans*, concedida pela Organização Panamericana da Saúde e Organização Mundial da Saúde (FIGURA 2).

Figura 2 – Evolução da área de distribuição do *T. infestans* no Brasil de acordo com os anos.



Fonte: BRASIL, 2009b

1.2.2 Transmissão por Transfusão sanguínea

Outro mecanismo classificado como via de transmissão ocorre através da transfusão sanguínea e sua ocorrência depende da concentração de parasita no sangue. A aquisição da doença a partir de um doador infectado pode ocorrer em 10-20% dos casos (Rassi Jr et al., 2010). Dessa forma, na década de 80, o Brasil iniciou um rigoroso controle sobre os bancos de sangue privados e públicos, como alternativa no controle da transmissão por transfusão sanguínea. De fato, os números mostraram que na América Latina a prevalência da infecção foi diminuída de 20 milhões, início dos anos 90, a 10 milhões no ano de 2000, e a população de risco de 100 para 40 milhões no mesmo período (Dias *et al*, 2002) após tais medidas de prevenção. Juntamente com a redução dos casos de transmissão via transfusão sanguínea ocorreu também a diminuição da transmissão via congênita (transmissão do tipo vertical), devido a diagnósticos e programas de tratamento para mulheres em idades férteis (DIAS *et al*, 2008).

1.2.3 Transmissão por Vias alternativas

Com as principais vias de transmissão sob controle em nosso País, as demais fontes foram, de certa forma, negligenciadas por não serem consideradas em outros programas governamentais (Dias e Neto, 2011). São denominadas vias alternativas: transmissão oral, por transplantes de órgãos, acidental em laboratórios e outras excepcionais (via sexual e fezes infectadas). Portanto, surtos regionais de infecção aguda ainda são detectados no Brasil com provável transmissão por via oral. Durante os anos de 2010 a 2013 ocorreram 476 notificações de casos de doença de Chagas aguda (DCA) decorrente da transmissão por via oral. Há registros dessa forma de transmissão nos estados do Pará, Paraíba, Amazônia, Santa Catarina e Ceará, podendo ser justificada pela utilização de leite materno infectado, ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com fezes ou urinas de triatomíneos infectados com *T. cruzi*.

No Estado do Ceará, foi notificado e confirmado o primeiro caso de transmissão oral em 2006, que envolveu 8 indivíduos da mesma família residente na cidade de Redenção (CE), infectados através da ingestão de uma sopa contaminada com o *T. cruzi*. (Cavalcanti *et al.*, 2009). Essa via é de difícil prevenção devido a aleatoriedade de seu acontecimento (Dias *et al.*, 2011). Na TABELA 2 podemos observar as principais vias de transmissão notificadas no Brasil.

Tabela 2 – Principais formas de transmissão da Doença de Chagas aguda no Brasil (2010-2013)

Provável fonte	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	C.Oeste	Total
Ignorado	122	2	0	0	8	132
Transfusional	6	0	0	0	0	6
Vetorial	38	9	3	0	5	55
Vertical	1	1	1	1	0	4
Oral	455	19	1	1	0	476
Outro	1	0	1	0	0	2
Total	623	31	6	2	13	675

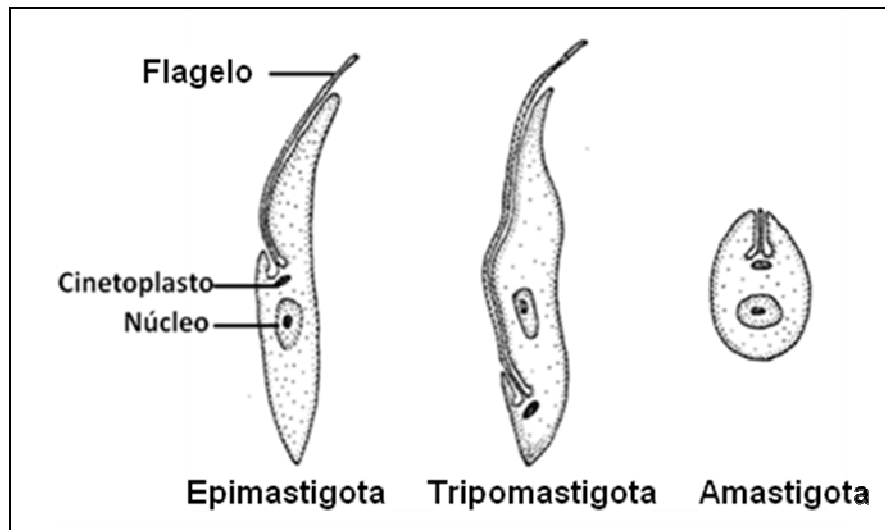
Fonte: BRASIL, 2014b.

1.3 O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado do sub-filo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. Possui um ciclo de vida com muitos estágios de desenvolvimento, com passagem por um inseto vetor (triatomíneo hematófago) e por células de mamíferos. A diferenciação das formas durante o ciclo compreende alterações na morfologia, no metabolismo, na expressão gênica e no mecanismo de sinalização (Lopes *et al.*, 2010).

O protozoário possui três formas evolutivas identificadas morfologicamente pela posição do cinetoplasto (onde se encontra o DNA mitocondrial) em relação ao núcleo da célula e pelo surgimento do flagelo, são estas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. (Martins *et al.*, 2012) (FIGURA 3).

Figura 3 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



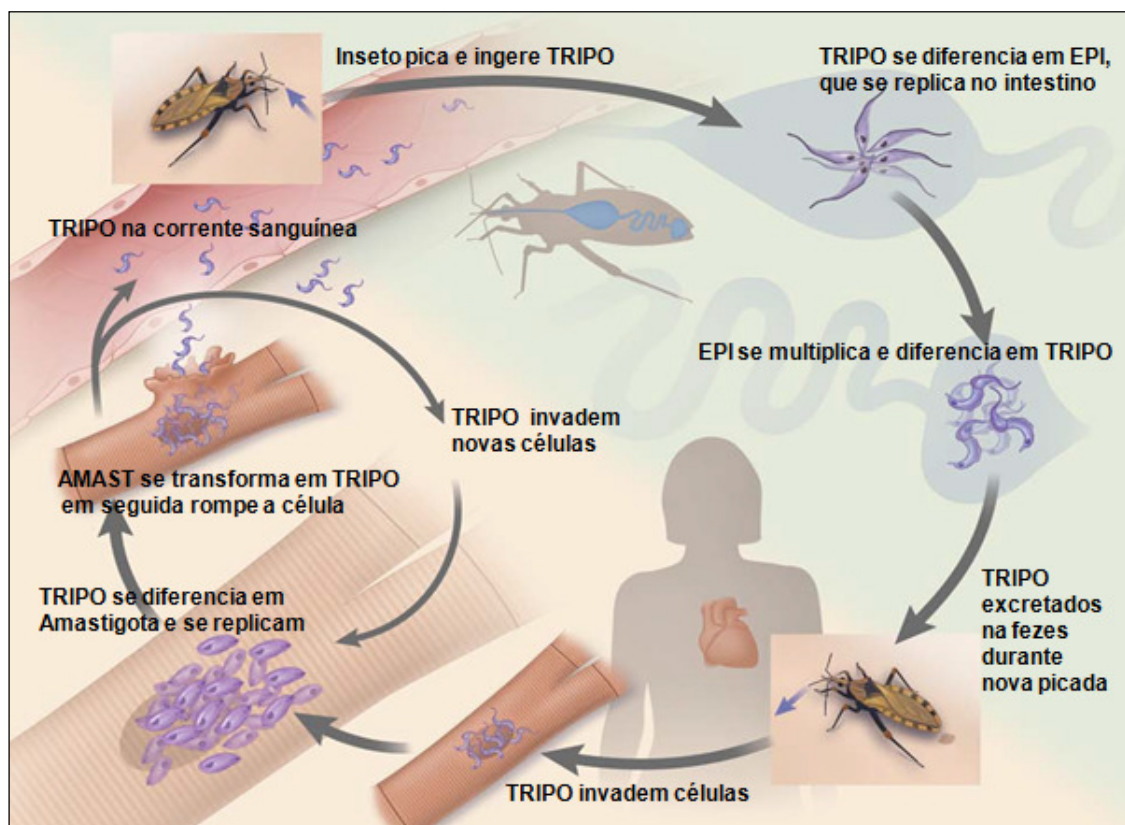
Fonte: Schuster e Sullivan (2002) modificado

As formas epimastigotas são formas multiplicativas encontradas no aparelho digestivo do triatomino e possuem intensa mobilidade. O seu cinetoplasto é localizado anteriormente ao núcleo e possui membrana ondulante pouco desenvolvida. Enquanto que os tripomastigotas, não possuem capacidade de replicação e corresponde a forma infectiva extracelular. São encontrados tanto em hospedeiros invertebrados (tripomastigota metacíclico), quanto em vertebrados (tripomastigota sanguíneo). Morfologicamente apresentam um núcleo grande e central com cinetoplasto arredondado posterior a esse núcleo e seu flagelo emerge lateralmente à bolsa flagelar aderindo ao longo do corpo (Martins *et al.*, 2012). A última forma de *T.cruzi* corresponde à forma intracelular amastigota, encontradas em tecido do hospedeiro vertebrado e caracterizadas morfologicamente por ausência de flagelo exterior e de membrana ondulante.

O ciclo biológico do *T.cruzi* é complexo e necessariamente tem passagem por hospedeiro vertebrado (mamífero) e invertebrado (inseto triatomíneo hematófago). O ciclo se inicia quando o inseto ao sugar o sangue do mamífero infectado, adquire a forma tripomastigota. Em seguida, no aparelho digestivo do vetor as tripomastigotas se diferenciam em epimastigota. No intestino do inseto os epimastigotas se multiplicam por divisão binária e voltam a se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos. A transmissão para o humano ou

outro vertebrado ocorre quando as fezes do inseto infectado são inoculadas através da ferida ou de mucosas após a picada. Os tripomastigotas metacíclico, agora presente na circulação sanguínea do hospedeiro, invadem as células endoteliais ou macrófagos e se diferenciam em amastigotas. Essas formas intracelulares se multiplicam por divisão binária ocupando todo o citoplasma celular e voltam a ser tripomastigotas com o crescimento do flagelo. Após lisarem as células, a tripomastigota é distribuído através dos vasos linfáticos e na corrente sanguínea para locais distante onde passam por mais ciclos de multiplicação intracelular (Rassi Jr, 2012). A finalização do ciclo ocorre quando um triatomíneo se alimenta de sangue contaminado e pica outro indivíduo, reiniciando assim, o ciclo (Cestari, 2006) (FIGURA 4).

Figura 4 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

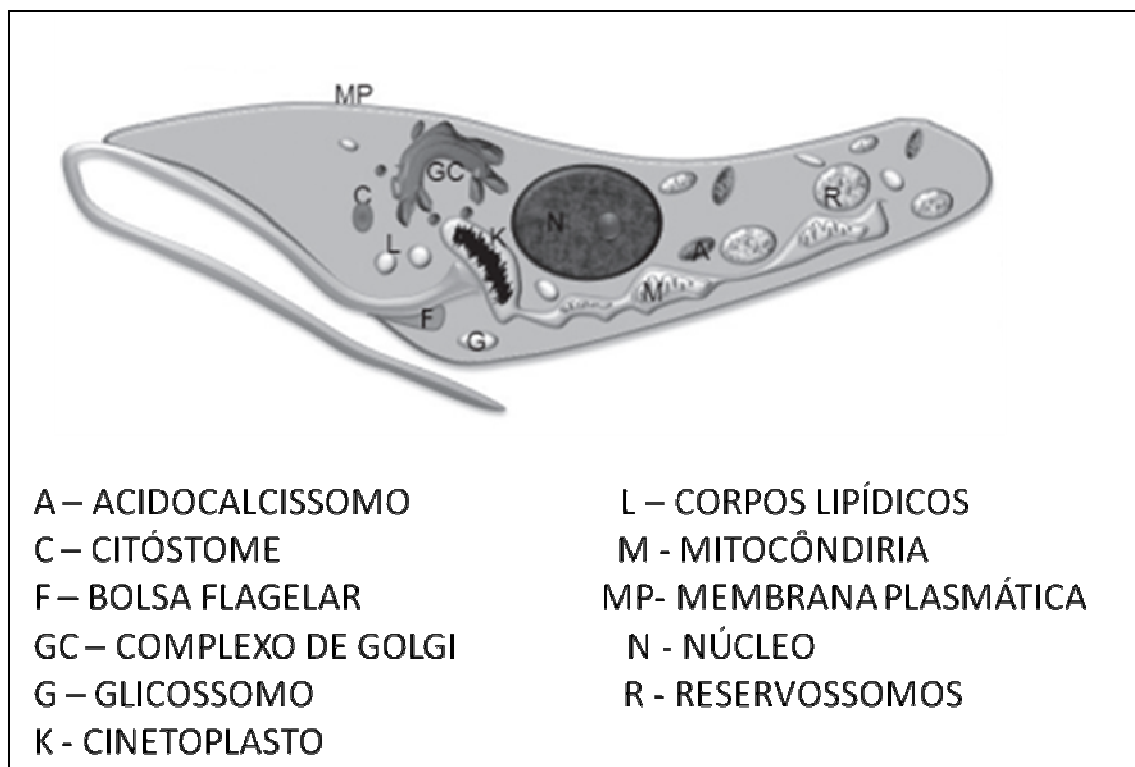


Fonte: Bern (2011) modificado

1.4 Biologia celular do *Trypanosona cruzi*

Através de diferentes técnicas utilizadas para caracterizar a organização estrutural das células nas formas evolutivas de *T. cruzi*, é possível identificar a localização celular e molecular de alvos terapêuticos de novas drogas. A seguir uma breve explanação sobre a morfologia do parasita. Estruturas podem ser visualizadas na FIGURA 5.

Figura 5 - Diagrama ultraestrutural da forma epimastigota de *T.cruzi*



Fonte: Martins *et al.* (2012) modificada

1.4.1 Membrana plasmática

O parasita interage com as células hospedeiras de vertebrados e dos invertebrados através da superfície celular (De Souza, 2009). A membrana plasmática de *T.cruzi* é constituída basicamente por dupla camada lipídica associadas com diferentes proteínas além de constituintes que estão em contato com o meio extracelular formando o glicocálice. As proteínas tais como, mucinas, transialidase e a família Tc85, estão distribuídas irregularmente ao longo da barreira bilipídica (De Souza, 2009). A camada glicocálice é constituída por

glicolipídios, glicoproteínas e lipopeptídios sendo que nas formas tripomastigotas é cerca de três vezes mais espessa que em epimastigota (Martins *et al.*, 2012).

1.4.4 Flagelo

O flagelo é uma estrutura que está presente nas três formas evolutivas, porém de maneira diferenciada. Sua principal função é proporcionar mobilidade ao parasita sendo também alvo de alguns grupos de drogas tripanocidas. São formados por 9 pares de microtúbulos periférico e um para central (De Souza, 2009) e emergem de uma invaginação da membrana plasmática, a bolsa flagelar.

Em epimastigotas e tripomastigotas o flagelo está aderido em uma estrutura na membrana denominada zona de adesão e em todas as formas está associado ao corpúsculo basal e ao cinetoplasto (De Souza 2009).

1.4.5 Mitocôndria e Cinetoplasto

A família *Trypanosomatidae* é caracterizada por possuir apenas uma mitocôndria, que está ramificada ao longo do corpo do parasita apresentando cristas e parede irregular. Está presente em todos os estágios evolutivos, podendo variar na organização estrutural e na composição molecular (Adade e Souto-Pradrón, 2010; Martins *et al.*, 2012).

A mitocôndria de *T. cruzi* está intimamente relacionada com uma estrutura de redes de DNA mitocondrial (kDNA), denominada de cinetoplasto, e representa 30% do DNA total da célula. Está localizado próximo ao núcleo, mas sua forma e estrutura variam com o estágio de desenvolvimento do parasita (De Souza, 2009). Nas epimastigotas e amastigotas se apresentam em forma de bastão, enquanto que nas formas tripomastigotas o kDNA se organiza em filamentos (Adade e Souto-Pradrón, 2010)

1.4.4. Reservossomos

São estruturas concentradas na região posterior das formas epimastigotas e perdidas durante a transformação em tripomastigota (Martins *et al.*, 2012). Acumulam proteínas e lipídios oriundos da endocitose, dessa forma sua principal função é armazenar e degradar moléculas. As formas tripomastigotas e amastigotas não possuem reservossomos, porém apresentam estruturas semelhantes com função lisossomal (*reservossomo-like*)(De Souza, 2009).

1.4.5 Glicossomos e acidocalcisomas

Os glicossomos são organelas de forma esféricas ou alongadas com matriz homogênea e envolvidas por uma membrana (De Souza, 2009; Adade e Sounto-Pádrón, 2010). A maioria dos mecanismos glicolídicos ocorre nos glicossomos sendo considerado um tipo especial de peroxissomos devido à presença de catalase.

Os acidocalcisomas são organelas vacuolar ácidas, capaz de transportar cálcio e prótons no parasita. O número e tamanho varia de acordo com a célula e são observadas em todas as formas de *T.cruzi* (Adade e Sounto-Pádrón, 2010). Suas principais funções são: Regulação de pH; armazenamento de cálcio, magnésio, fósforo; regulação osmótica (De Souza, 2009).

1.4.6 Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático

A estrutura de Golgi e o retículo endoplasmático (RE) do *T.cruzi* possuem mesma estrutura observada nas células eucariontes. O complexo de Golgi (CG) se localiza perto da bolsa flagelar e do cinetoplasto e está envolvido na glicosilação de proteínas e no tráfico de membrana (Martins *et al.*, 2012). O retículo endoplasmático participa na produção de proteínas e lipídios e estão distribuídos por todo o corpo do parasita. O complexo CG-RE é alvos de diferentes classes de drogas tripanocidas que afetam sua fisiologia resultando em alterações ultraestruturais (Adade e Sounto-Pádrón, 2010).

1.4.7 Núcleo

O núcleo do *T. cruzi* apresenta uma típica membrana com poros e cromatina condensada. A membrana nuclear permanece intacta durante todo o processo de divisão, entretanto, ocorre desorganização interna com aparecimento de microtúbulos, dispersão da cromatina e desaparecimento do nucléolo (De Souza, 2009). Os estudos ultraestruturais do núcleo podem indicar o mecanismo de morte do parasita na presença de diferenças drogas (Adade e Sounto-Pádrón, 2010).

1.5 Evoluções clínica da Doença de Chagas

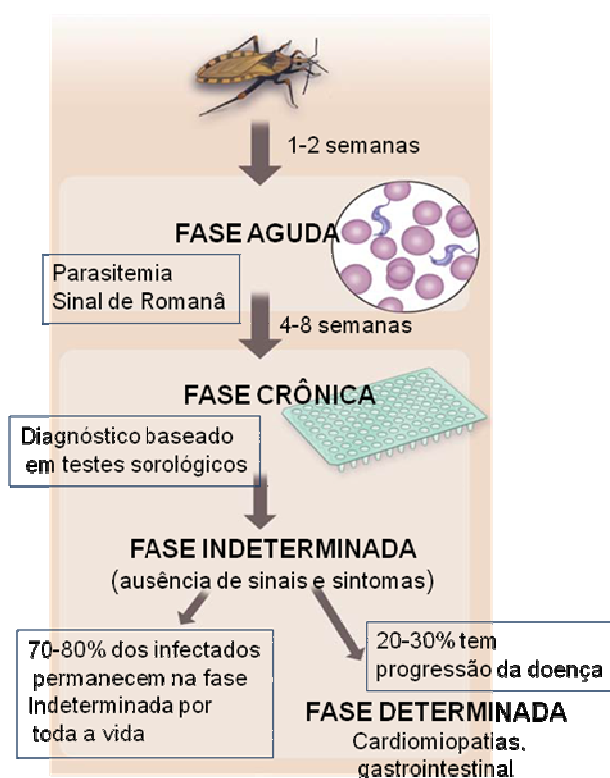
A Doença de Chagas possui duas fases distintas, classificadas de acordo com a evolução clínica: a fase aguda e a fase crônica (FIGURA 6). A infecção inicia-se no local de entrada do parasita com infecção de leucócitos e células dos tecidos subcutâneos, desenvolvimento de edema intersticial e infiltração de linfócitos no local (Rassi Jr *et al.*, 2012). Após a disseminação através dos vasos linfáticos e células sanguíneas, os parasitas infectam células musculares e dos gânglios. Essa fase é caracterizada por uma parasitemia que pode se visualizada microscopicamente.

No início da fase aguda os sintomas são moderados ou pode ser assintomática, pois os níveis de parasitas ainda são baixos. Normalmente, essas manifestações aparecem após 1-2 semanas da infecção, nesses casos são observados febre, mal-estar, aumento do fígado, baço e gânglios linfáticos e edema subcutâneo (Pereira e Navarro, 2013). Aproximadamente de 60-80% dos indivíduos acometidos que recebem tratamento adequado são curados e a morte durante essa fase pode ocorre ocasionalmente, com taxas de 5-10%, como resultado de miocardites severas ou meningoencefalites (Rassi Jr *et al.*, 2010). Esta fase dura cerca de 4 a 8 semanas e, após esse período, os indivíduos acometidos que não apresentam sintomas progridem para a denominada fase crônica indeterminada em que a parasitemia decresce, porém, os tecidos continuam infectados. Cerca de 70-80% desses pacientes não apresentam sintomas durante a fase crônica indeterminada, mas apresentam positividade para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, eletrocardiograma normal, esôfago e cólon também normais (Rassi Jr *et al.*, 2010) permanecendo dessa forma até o final da vida. Entretanto, 20-30% dos indivíduos portadores da fase crônica podem evoluir para fase determinada da doença, apresentando severos sintomas.

A fase crônica determinada também é descrita como forma cardíaca e digestiva, em que as manifestações mais agravantes da doença aparecem após 10-30 anos do início da infecção. A cardiomiopatia da Doenças de Chagas é caracterizada por processo inflamatório crônico ocasionando danos como, arritmias, falência do coração e tromboembolismo (Bern, 2011; Coura e Pereira, 2010) de forma que ocorre miocardite progressiva com o comprometimento da função contrátil do músculo cardíaco. Já a forma digestiva, as manifestações clínicas são devido a dilatação do trato gastrointestinal (megacólon e megaesôfago).

Na fase aguda e crônica, as manifestações clínicas não são específicas para o estabelecimento do diagnóstico de Chagas, o que dificulta um tratamento eficaz. Além disso, a existência de uma fase assintomática intermediária pode fazer com que a doença seja indetectável por muitos anos (Ortí-Lucas *et al.*, 2014).

Figura 6 - Fases da infecção do *Trypanosoma cruzi* na Doença de Chagas



Fonte: Bern (2011) modificado

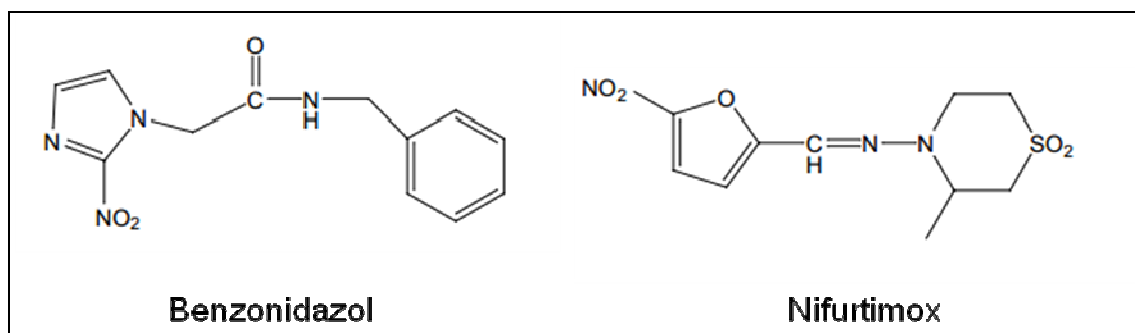
1.6 Farmacoterapia da Doença de Chagas

As primeiras drogas com eficácia comprovada contra *Trypanosoma cruzi* foram o Benzonidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche) e o Nifurtimox (Lampit®, Bayer), desenvolvidas entre as décadas de 60 e 70 (Bern, 2011) (FIGURA 7). No Brasil, apenas o benzonidazol é comercializado, sendo produzido pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) sob a marca Benzonidazol LAFEPE desde 2008.

O benzonidazol possui maior segurança e eficiência que o nifurtimox, portanto, é utilizado como primeira escolha no tratamento (Viotti *et al.*, 2009). O fármaco atua como uma pró-droga sendo ativado no interior do parasita por uma nitroreductase mitocondrial NADH-

dependente que reduz o benzonidazol, gerando um metabólito citotóxico (Wilkinson *et al.*, 2011). Porém, podemos encontrar relatos na literatura que sua eficácia varia de acordo com a área geográfica em que realiza o tratamento, provavelmente devido à variabilidade da cepa de *T. cruzi* (Andrade, *et al.*, 1999; Cançado, 1999; Kirchhoff, 1999)

Figura 7 – Estruturas químicas dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox



Fonte: Urbina e DoCampo (2003)

Diversos estudos admitem a alta efetividade de ambas as drogas no tratamento da fase aguda, cerca de 80% de cura parasitológica (Cançado, 1999; Coura e Castro, 2002; Rassi Jr *et al.*, 2010) entretanto, necessitam de longos períodos de terapia. O tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível após a confirmação e desde 1983, tornou-se consenso o uso de benzonidazol 5 a 10mg/Kg/dia durante 30 a 60 dias.

O benzonidazol apresenta efeitos adversos graves, tais como, agranulocitose, depressão da medula óssea, polineuropatias, parestesias e polineurites de nervos periféricos (Coura e Castro, 2002; Marin-Neto *et al.*, 2009) o que podem levar à interrupção do tratamento.

Uma vez que a doença tenha progredido para fase crônica, nenhuma medicação apresenta atividade satisfatória. Dados na literatura citam que a taxa de cura pode variar de 8% a 30% em adultos e, em crianças menores de 15 anos, essa taxa é elevada para 50% - 60% (Oliveira *et al.*, 2008).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), na fase crônica recente (5 a 12 anos após a infecção) é indicado o tratamento mesmo sem evidências de sucesso. Na fase crônica tardia, o uso do benzonidazol é indicado pela OMS visando impedir a evolução da

doença e reduzir os níveis de parasitemia. Na decisão sobre a indicação do tratamento, deve ser levado em consideração o custo benefício, devido ao uso prolongado e os frequentes efeitos adversos.

Outros medicamentos têm sido testados em ensaios clínicos no tratamento de Chagas, como os antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol, porém, os resultados ainda são incertos (Apt *et al.*, 1998; Apt, 2010). Estudos mostraram que um antifúngico sistêmico análogo do itraconazol, o posaconazol, era capaz de eliminar seletivamente amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em culturas de cardiomiócitos (Silva *et al.*, 2006). Recentemente, Dias *et al.*, (2014) descreveram a falta de sucesso do tratamento clínico com o posaconazol. Compostos que atuam na biossíntese do esterol, inibidores do metabolismo pirofosfato e protease cisteína também estão sendo avaliados clinicamente como nova alternativa de tratamento. (Urbina, 2009).

1.7 Venenos de serpentes como moléculas Bioativas

O estudo do potencial terapêutico dos venenos ofídicos vem cada vez mais despertando grande interesse da comunidade científica como fonte de modelos moleculares para o desenho de novas drogas. As toxinas de origem animal, com sua elevada potência e seletividade, têm contribuído na compreensão de problemas vasculares, neurológicos, processos inflamatórios, analgesia, processos alérgicos, asma, entre outros (Harvey *et al.*, 1998; Mortari *et al.*, 2007).

Os venenos de serpentes constituem misturas complexas com 90 a 95% do peso seco constituído por componentes proteicos com ou sem atividade catalítica (Bon, 1997). Portanto, alguns de seus componentes podem agir sinergicamente entre si modulando diferentes ações (Harvey, 2010). O veneno ofídico é constituído por: fosfolipases A₂, proteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidase, acetilcolinesterase, fatores de crescimento, ativadores da proteína C, lectinas, proteínas ligantes ao fator Von Willebrand; peptídeos (potenciadores da bradiginina e desintegrinas); componentes orgânicos de baixo peso molecular (serotonina, histamina e nucleosídeos) e íons inorgânicos como o cálcio, cobalto, magnésio e potássio (Ramos e Selistre-De-Araujo, 2006).

Os venenos ofídicos e seus derivados apresentam um alto potencial biotecnológico (Bello *et al.*, 2005; Higuchi *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2007; Sanchez e Swenson, 2007; Sanchez *et al.*, 2007; Sanchez e Eble, 2009), pois possuem estruturas com grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que os tornam

favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novas drogas (Altmann, 2001; Clardy e Walsh, 2004). A partir do século 20, os estudos com toxinas isoladas e purificadas emergiram no campo da pesquisa por novos agentes terapêuticos (Koh e Kini, 2012).

O potencial terapêutico dessas substâncias foi inicialmente difundido a partir da descoberta e isolamento dos primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (ECA). Rocha e Silva e colaboradores foram os pioneiros, quando em 1949, observaram que o plasma sanguíneo quando incubado com o veneno da *Bothrops jararaca* gerava um fator hipotensor, a bradicinina (FERREIRA, 1965). Tal descoberta foi um marco nas pesquisas sobre hipertensão e conduziu a muitos outros estudos que culminaram no isolamento dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) por Ferreira e colaboradores (1965). Estas substâncias foram utilizadas para validar os inibidores da ECA como alvos no tratamento da hipertensão e conduzir ao desenvolvimento de moléculas ativas como protótipo de fármacos anti-hipertensivos, como o Captopril®. Desde então, podemos encontrar no mercado farmacêutico produtos originados de componentes de venenos de diversas espécies de serpentes (TABELA 3).

Tabela 3 - Produtos elaborados a partir de toxinas de venenos de serpentes

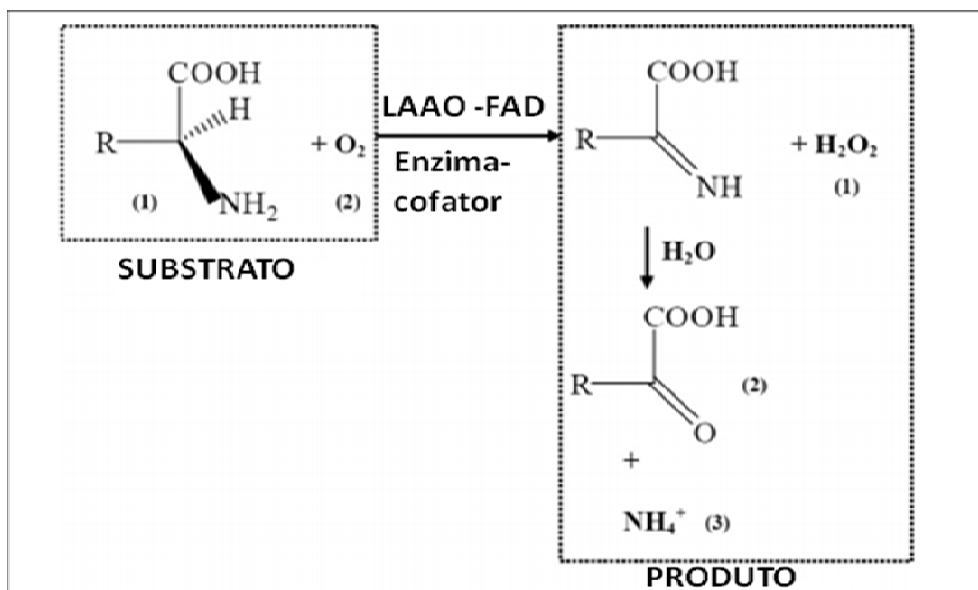
Droga / nome comercial	Ação / tratamento	Origem
Captopril; Enalapril	Inibidor da ECA/ Hipertensão	<i>Bothrops jararaca</i>
Defibrase®	Inibidor da trombina e protrombina	<i>Bothrops moojeni</i>
Integrilin ®	Inibidor de integrina (anti-trombose)	<i>Sistrurus m. barbour</i>
Viprinex®	Inibidor de fibrinogênio	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>
Hemocoagulase	Efeito <i>trombina-like</i> e atividade tromboplastina/ prevenção e tratamento de hemorragia	<i>Bothrops atrox</i>
Protac	Ativador da proteína C / diagnósticos clínicos de desordens hemostáticas	<i>Agkistrodon contortix contortix</i>
Reptilase	Diagnósticos para desordens de coagulação	<i>Bothrops jararaca</i>
Baquting	Hemocoagulase (anti-hemorragico)	<i>Bothrops atrox</i>

Fonte: Koh *et al.*, (2006);Koh e Kini, (2012).Modificados

1.7.1 L-aminoácido oxidase

As enzimas L- aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas pertencentes à classe de oxidoreductase que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido a um α -cetoácido, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (FIGURA 8) e são distribuídas em diferentes espécies incluindo insetos, fungos, bactérias e serpentes (Du e Clemetson, 2002). Suas estruturas, massa molecular e pontos isoelétricos são bastante variados (Izidoro *et al.*, 2014). A molécula pode ter aproximadamente massa molecular de 120–150 kDa (forma nativa) ou 55–66 kDa (forma monimerica) (Ali *et al.*, 2000). Em estudo anterior realizado por nosso grupo, Torres e colaboradores (2010) isolaram e purificaram a L-aminoácido oxidase do veneno total da *Bothrops marajoensis* obtendo uma proteína ácida de massa de 67 kDa.

Figura 8 – Representação sistemática da reação química catalisada pela L-aminoacido oxidase (LAAO)



Fonte: Yu *et al.*, (2014) modificada

As LAAOs oriundas de venenos de serpentes (LAAOSV) são encontradas em altas concentrações e uma variação quantitativa de maneira inter e intraespecífica no veneno total (Izidoro *et al.*, 2014). É descrito que a existência dessas toxinas no veneno total, pode ser a razão dos seus efeitos seus protetores contra agentes naturais como parasitas e bactérias (Ande *et al.*, 2006).

De acordo com Macheroux e colaboradores (2001) até meados dos anos 90, os estudos com a LAAOSV eram focados nas análises estruturais e funcionais da molécula, enquanto que nos últimos anos os estudos seguiram para avaliar seus efeitos e potencial farmacológico (Izidoro *et al.*, 2014).

Os efeitos antiparasitários das LAAOs de venenos de diferentes famílias de serpentes têm sido reportados. As ações contra os parasitas da *Leishmania donavani* e *Trypanosoma cruzi* e outras espécies, têm sido reportado para venenos da *B. moojeni*, *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. pirajai* e *Crotalus viridis* (Alves-Paiva *et al.*, 2011; Deolindo *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2002; Izidoro *et al.*, 2006; Stabéli *et al.*, 2004; Tempone *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por nosso grupo, demonstramos a ação do veneno da *Bothrops marajoensis* e sua fração LAAO sobre os parasitas *Leishmania amazonensis* (Torres *et al.*, 2010). Portanto, o presente trabalho é relevante visando identificar novas moléculas com atividade tripanocida.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças parasitárias necessitam de fundamental atenção, tanto devido ao aumento significativo da resistência dos parasitos aos agentes terapêuticos disponíveis, como ao fato de serem comumente classificadas como doenças negligenciadas, as quais afligem países em desenvolvimento e possuem pouco incentivo para a pesquisa, para o desenvolvimento tecnológico e para inovação geradora de produtos necessários à saúde das populações desfavorecidas.

A Doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública devido à terapia inadequada e eficácia limitada. Assim, o atual cenário farmacológico aplicado à Doença de Chagas chama a atenção para a necessidade da busca de drogas mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Dentro deste contexto, substâncias bioativas de origem animal, podem servir de modelos para serem utilizadas como drogas na terapêutica. O interesse na procura de novas substâncias colocou os venenos animais como uma das mais promissoras fontes de compostos naturais.

As L-amino ácido oxidase são consideradas uma classe de enzimas multifuncionais, portanto, o presente estudo se propõe a avaliar o potencial terapêutico do L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBm) sobre as formas epimastigotas, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, bem como avaliar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade tripanocida e seus respectivos efeitos na fisiologia e morfologia do parasita, na tentativa de identificar novas substâncias que poderão servir de modelos para obtenção de novas drogas para a Doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial tripanocida da L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBmar) em culturas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

3.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar a atividade enzimática da LAAOBmar por quantificação do peróxido de hidrogênio
- b. Determinar a atividade biológica da LAAOBmar sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* na presença e ausência da catalase (CAT).
- c. Avaliar a toxicidade da LAAOBmar sobre células de mamíferos LLC-MK₂ e determinar o índice de seletividade.
- d. Analisar o percentual de inibição e o índice de sobrevivência de amastigotas de *T. cruzi* em células LLC-MK₂ tratadas com LAAOBmar.
- e. Analisar as alterações ultraestruturais induzidas pela ação da LAAOBmar através da microscopia eletrônica de transmissão em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*
- f. Verificar os possíveis mecanismos de morte celular por citometria de fluxo
- g. Analisar os efeitos da LAAOBmar sobre a integridade da membrana plasmática e da mitocôndria de epimastigotas, através da microscopia confocal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC), Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará com colaborações do Instituto de Biomedicina (IBIMED - UFC) para as análises em microscopia de confocal e do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ - Pernambuco) com os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

4.1 Amostras

A enzima L-aminoácido oxidase do veneno da *Bothrops marajoensis* foi cedida pelo Professor Marcos H. Toyama (Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista) isolada e purificada como descrita por Costa Torres e colaboradores (2010).

O fármaco de referência Benzonidazol (99,5% de pureza), utilizado como controle positivo, foi doado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). As culturas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y e de células LLCM-K₂ foram doadas pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

4.2 Atividade enzimática LAAOBmar

O ensaio foi realizado com o intuito de se determinar a atividade enzimática da LAAOBmar. Para tanto, utilizamos 10µL de solução enzimática e 90µL/poço de solução de substrato para iniciar a reação como descrito por Kishimoto e Takahashi (2001) com modificações. A mistura da reação padrão continha 250 mM de L-leucina, 2 mM de o-fenilenodiamina (OPD), 0,81 U / ml de peroxidase e LAAOBmar em um volume total de 100 µl / poço de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Após incubação a 37 ° C durante 60 min, a reação foi finalizada por adição de 50 µL de H₂SO₄ 2M. A absorvância da mistura reacional foi medida a 480 nm, e a atividade foi expressa como o aumento de absorvância. Padrões de peróxido de hidrogênio foram utilizados e os dados calculados por regressão linear sendo a atividade da LAAOBmar expressa como nmoles H₂O₂/min através do programa GraphPad Prism 5.0.

4. 3 Cultivos de parasitas e de células de mamíferos

As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (*Liver infusion tryptose*) de acordo com Camargo (1964), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina, Sigma, Brasil) e mantidos a 28°C em incubadora B.O.D (Fanem, Brasil). Os parasitas utilizados para os experimentos foram provenientes de culturas da fase exponencial, obtida através da realização de uma curva de crescimento por contagem diária dos parasitas por 12 dias. Com repiques realizados a cada 7-8 dias.

As formas tripomastigotas foram obtidas por infecção de células LLC-MK₂ (*Rhesus monkey kidney*). As células foram cultivadas (2×10^5 / mL) em garrafas de cultura celular (25 cm²) em meio MEM (*Minimum Essential Medium*, Vitrocell, Brasil), suplementado com 10% de soro bovino fetal e, após 48 horas, estágio de semiconfluência, infectadas com suspensão de tripomastigota (1×10^7). As células infectadas foram então mantidas em meio MEM a 2% de soro bovino fetal em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 5-6 dias, período em que se observou a eclosão das células e consequentemente tripomastigotas no sobrenadante. Em seguida, os parasitas foram retirados do sobrenadante, centrifugados (3.500 rpm / 7 minutos) e disponíveis para a realização dos ensaios.

As células LLC-MK₂ utilizadas para infecção de tripomastigota e para ensaio de citotoxicidade foram cultivadas em garrafas de cultura celular (25 cm² ou 75 cm²) em meio MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A linhagem foi mantida em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C com visualização diária do crescimento em microscópio óptico invertido.

4. 4 Avaliação da atividade da LAAOBmar sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *T.cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas conforme item anterior e, após atingirem a fase exponencial de crescimento, os parasitas foram subcultivados em meio LIT na concentração de 1×10^6 cél/mL em placa de 96 poços e tratados com diferentes concentrações de LAAOBmar (3,12 - 50 µg/mL), benzonidazol (3,12 - 100 µg/mL) ou sem tratamento (grupo controle). As placas foram incubadas por 48 e 72 horas (Becerra *et al.*, 2012) em estufa B.O.D a 28°C e após esse período avaliados por contagem direta em câmara de Neubauer e calculado a CI₅₀ (concentração inibitória para 50% das células).

Culturas de formas tripomastigotas obtidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas, foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 cél/mL em placa de 96 poços em meio MEM 2% suplementados com soro bovino fetal e tratados com diferentes concentrações de LAAOBmar (0,39 – 1,56 µg/mL), benzonidazol (6,25 - 200 µg/mL) ou sem tratamento (grupo controle) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C . A viabilidade foi determinada após 24 horas por quantificação em câmara de Neubauer e realizado o cálculo da CL₅₀ (concentração letal para 50% das células).

4. 4. 1 *Envolvimento do peróxido de hidrogênio no mecanismo de morte celular*

Com o intuito de avaliar o envolvimento do peróxido de hidrogênio proveniente da reação catalisada pela LAAO, na morte celular das formas epimastigotas e tripomastigotas, foram realizados ensaios com grupos tratados com diferentes concentrações de LAAOBmar na presença da catalase (CAT, 100µg/mL, Sigma-Aldrich, Brasil). Os experimentos seguiram os protocolos de citotoxicidade para cada forma parasitária como descrito no item anterior.

4. 5 Padronização da infecção das células LLC-MK₂ com formas tripomastigotas

A padronização da infecção de células LLC-MK₂ com formas tripomastigotas foi realizada com o objetivo de se definir a razão de parasita por célula e efetuar os ensaios em formas amastigotas.

Aproximadamente 5×10^4 , 1×10^5 e 2×10^5 céls / mL foram subcultivadas em placas de microcultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis (13mm) em meio MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os parasitos então foram adicionados após 24h, período de fixação das células, na proporção de 10:1 e 100:1 em meio MEM suplementado com 2% de soro bovino fetal em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24h de interação parasito-célula, os tripomastigotas não internalizados foram removidos e um novo meio de cultura adicionado em cada poço. As células foram novamente incubadas nas condições de cultivo por até 3 dias com trocas de meio e observação em microscópio ocular realizadas diariamente a fim de se visualizar a diferenciação e multiplicação das formas amastigotas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas, fixadas em solução de Bouin e coradas com corante Giemsa para seguinte montagem em lâminas (Adade *et al*, 2011). As análises foram realizadas em microscópio óptico normal comparando as diferentes razões de infecção e tempo de infecção.

4. 6 Avaliação da toxicidade da LAAOBmar em células de mamíferos LLC-MK₂

O potencial citotóxico da LAAOBmar sobre a linhagem LLC-MK₂ teve o propósito de selecionar as concentrações a serem testadas nos experimentos das formas intracelular de *T. cruzi*. As células LLC-MK₂ com concentração obtida nos ensaios de padronização, foram subcultivadas em placas de microcultura em meio MEM enriquecido com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina nas condições de cultivo por 24 horas para permitir a adesão.

A viabilidade celular foi mensurada pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolium), que se baseia na reação colorimétrica formada pela redução de sais de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas a formazan (MOSMANN, 1983). As células foram tratadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações LAAOBmar (0,39 - 50 µg/mL) e, após 24 h, a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de ELISA (Asys Expert Plus, Biochrom, EUA). O valor da CC₅₀ foi estimado e o Índice de Seletividade (SI) foi calculado através da razão da CC₅₀ LLC-MK₂ e CL₅₀ da forma tripomastigota de *T. cruzi* com o objetivo de comparar a citotoxicidade entre células de mamíferos e parasitas.

4. 7 Avaliação do efeito da LAAOBmar sobre as formas amastigotas intracelulares

Os ensaios foram realizados de acordo com os parâmetros estabelecidos na padronização da infecção das células LLC-MK₂ com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Lamínulas contendo culturas de células infectadas após 24 h foram tratadas com diferentes concentrações de LAAOBmar (0,78, 0,39 e 0,18 µg/ mL) ou sem tratamento e após 24 h de incubação as lamínulas foram lavadas, fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa para seguinte montagem em lâminas (Adade *et al*, 2011). O número de amastigota foi analisado por contagem em microscópio óptico totalizando 300 células. Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas, percentual de inibição das formas amastigotas e Índice de Sobrevivência (IS). O IS é calculado a partir da seguinte fórmula: % cel infect x nº amastigotas/células (Vendrametto *et al.*, 2010).

4. 8 Análises ultraestruturais por Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

Epimastigotas foram tratados por 48 horas com LAAOBmar (CI_{50} e $2 \times CI_{50}$) e tripomastigotas 24 horas com LAAOBmar (CL_{50} e $2 \times CL_{50}$). Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 5,500g e lavados 2 vezes em PBS. A fixação foi realizada através de uma solução de 2,5% Glutaraldeído, 4% paraformaldeído em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 durante 60 min a 4 °C. Após três lavagens no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas no escuro por uma hora em uma solução contendo 1% OsO_4 /0,8% ferricianeto de potássio/5 mM $CaCl_2$ em tampão cacodilato 0,1M. As células foram desidratadas em baterias crescentes de acetona e incluídas em resina Polybed 812 (PolySciences, Warrington, PA, USA) por 48 h a 60 °C. Cortes ultrafinos obtidos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2Spirit Biotwin, FEI Company, Holanda), operado a 100 KV.

4. 9 Efeito da LAAOBmar analisado por citometria de fluxo

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram analisadas em citometria de fluxo a fim de se observar os possíveis eventos envolvidos na morte celular. Para tanto, utilizamos o iodeto de propídio (IP), para avaliarmos a permeabilização na membrana plasmática e o marcador Anexina V-FITC que se liga a fosfatidilserina uma proteína de membrana exposta durante processo apoptótico. Parasitas (1×10^6 cel/mL) foram cultivados em placas de 12 poços e tratados com LAAOBmar ($CI_{50}/2$) por 24 horas e após este período as culturas foram centrifugadas (3000rpm/7mint), lavadas com PBS pH 7,4 e ressuspensas em tampão de ligação (Hepes/NaOH 10Mm, NaCl 140Mm, $CaCl_2$ 2,5 Mm, pH 7,4). Em seguida foram incubadas com uma solução de iodeto de propídio (1mg/ mL, Sigma - Aldrich) e Anexina V-FITC (50µg/ mL, Becton-Dickinson) por 15 min no escuro (Alves *et al.*, 2008; Matsuo *et al.*, 2010). Após esse período as células foram lavadas novamente e então realizada leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson) (Deolindo *et al.*, 2005; Izumi *et al.*, 2012). Os resultados foram expressos em percentual de eventos positivos.

4. 10 Efeito da LAAOBmar analisado por microscopia confocal

A avaliação das possíveis alterações na membrana plasmática e na mitocôndria foi realizada utilizando os marcadores iodeto de propídio (IP) e rodamina 123 (Rod 123), respectivamente. Para as análises, epimastigotas (10^6) foram incubados com LAAOBmar (CI_{50} e $CI_{50}/2$) por 48 horas e após esses período as culturas foram centrifugadas, lavadas e marcadas com iodeto de propídio ($10\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma – Aldrich) ou rodamina 123 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen) por 15min. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas e observadas diretamente em microscópio confocal Olympus IX81. As imagens foram adquiridas usando laser HeNe (488 nm) para IP e KrAg (543 nm) para rodamina.

4. 11 Análises de dados

Os ensaios foram realizados em duplicata em 2 ou 3 experimentos independente, expressos em média \pm erro padrão da média e os valores de CI_{50} para epimastigotas, CC_{50} para células LLC-MK₂ e CL_{50} para tripomastigotas, foram determinadas por regressão não linear com intervalo de confiança 95%. Comparações estatísticas foram analisadas utilizando ANOVA com *Dunett's post-test* no programa GraphPad Prism 5.

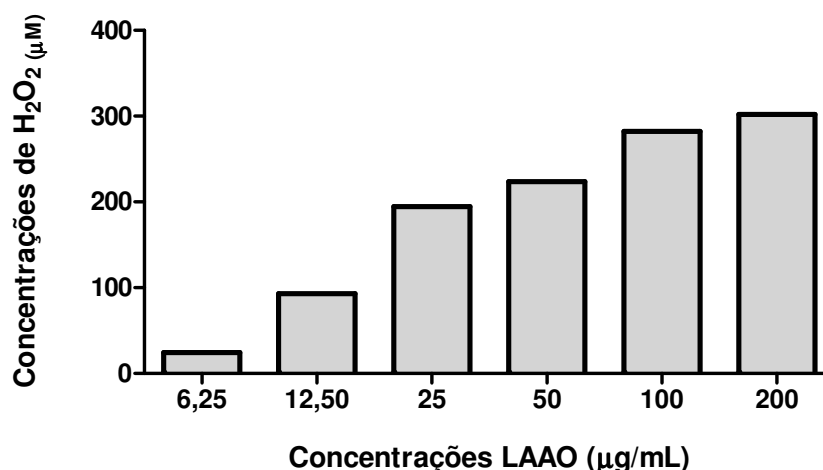
5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de determinação da atividade enzimática da LAAOBmar

O ensaio para confirmar a atividade enzimática da substância em estudo foi baseado no conhecimento de que as LAAOs podem catalisar a oxidação estereoespecífica de L-aminoácidos para formar α -ceto ácido correspondente, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A quantificação de H_2O_2 formado é o teste mais utilizado para o ensaio de atividade da LAAO sendo descrito como um teste padrão ouro (Yu *et al.*, 2014).

Para tal, inicialmente foi realizada uma curva padrão de peróxido de hidrogênio e uma curva de concentrações de LAAOBmar *versus* absorbância da mistura reacional (enzima mais substrato). Em seguida, a interpolação desses dados nos forneceu as concentrações de H_2O_2 produzida pela substância em estudo. De acordo com a FIGURA 9, observamos que a produção de peróxido de hidrogênio, aumenta de acordo com o aumento das concentrações de LAAOBmar testada. Portanto, comprovamos a atividade enzimática da L-aminoácido oxidase do veneno da *Bothrops marajoensis* e dessa forma foi possível prosseguir com os ensaios de atividade biológica.

Figura 9 – Atividade enzimática da L-aminoácido oxidase do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBmar).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: O gráfico representa a quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) liberada (μM) por concentração testada de LAAOBmar ($\mu g/mL$)

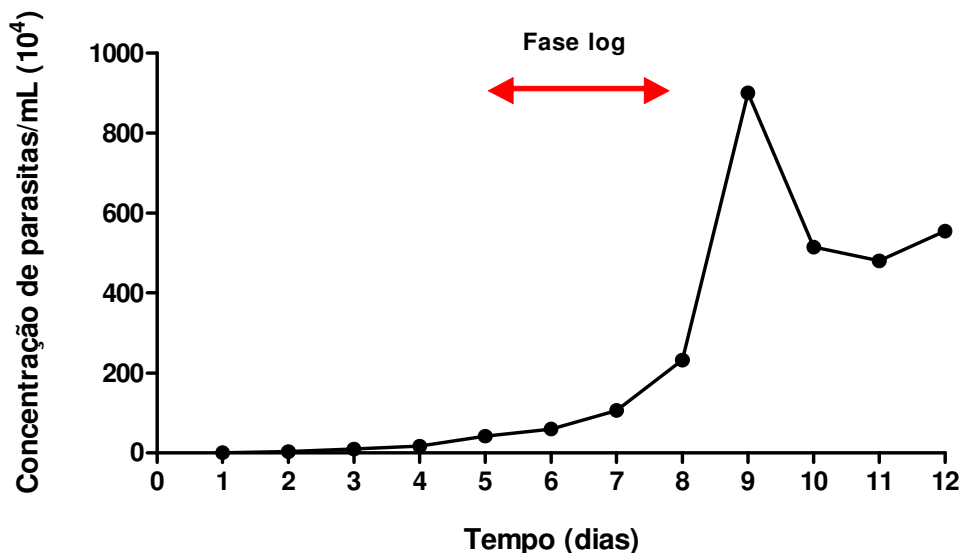
5. 2 Avaliação da atividade da LAAOBmar sobre as formas epimastigotas e tripomastigota de *T.cruzi*

5.2.1 Curva de crescimento das formas epimastigotas

A avaliação da taxa de crescimento dos epimastigotas nos fornece uma indicativa do comportamento de replicação do parasita e, dessa forma, podemos determinar o melhor dia para realização dos experimentos.

Alíquotas da suspensão de culturas de parasitas foram analisadas através da contagem direta durante 12 dias, com concentração inicial de 10^4 parasitas/mL. De acordo com a FIGURA 10, podemos observar que a fase *log* (fase exponencial), ocorreu a partir do 5º dia até aproximadamente o 9º dia de avaliação, sendo este o intervalo ideal para a realização dos experimentos.

Figura 10 - Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi* durante 12 dias de cultivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Ação inibitória da LAAOBm na replicação das formas epimastigotas

Os ensaios de atividade antiparasitária foram realizados inicialmente frente às formas epimastigotas de *T.cruzi* cepa Y após 48 e 72 horas de incubação. Nossos resultados demonstraram que a LAAOBmar nas concentrações testadas (3,12 - 50 µg/mL), possui efeito inibitório no crescimento das formas epimastigotas de forma dose e tempo dependente, chegando a aproximadamente 100% de inibição na maior concentração testada. A concentração inibitória para 50% das células (CI₅₀), equivalente a 48 horas de incubação foi de 6,31µg/mL diminuindo para 5,85µg/mL quando o tratamento foi de 72 horas, conforme FIGURA 11A e 11B, respectivamente.

Foram utilizados grupos controle positivo com o fármaco de referência benzonidazol (3,12 - 100 µg/mL) nas mesmas condições experimentais, apresentando CI₅₀ 48 h = 19,18 µg/mL e CI₅₀ 72 h = 8,23 µg/ml (FIGURA 12A e 12B), portanto menos efetivo quando comparado com a LAAOBmar. Na TABELA 4, podemos conferir as substâncias testadas e os respectivos valores de CI₅₀ dos grupos tratados com LAAOBmar e benzonidazol.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) proveniente das reações catalisadas pelas LAAOs tem sido relacionado como o possível agente responsável pelas atividades biológicas de tal enzima. Desta forma, nosso trabalho avaliou o envolvimento do H₂O₂ no efeito inibitório do crescimento dos epimastigotas através da realização de ensaios com grupos tratados com LAAOBmar na presença da catalase (CAT; 100 µg/mL), enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio. Na FIGURA 11A podemos observar que nos grupos tratados com LAAOBmar na presença da CAT, a inibição do crescimento dos parasitas é diminuída, porém não é abolida.

Além disso, na maior concentração testada (50 µgmL) a atividade da LAAOBmar sobre os epimastigotas, praticamente não é afetada. Na FIGURA 11B, os resultados indicam que a ação citotóxica da LAAOBmar é pouco reduzida pela presença de CAT no meio quando incubada por 72 horas. Na TABELA 5 e 6, podemos comparar os percentuais de inibição do crescimento das formas epimastigotas, quando tratadas somente com LAAOBmar ou com LAAOBmar + CAT após 48 h e 72 h, respectivamente.

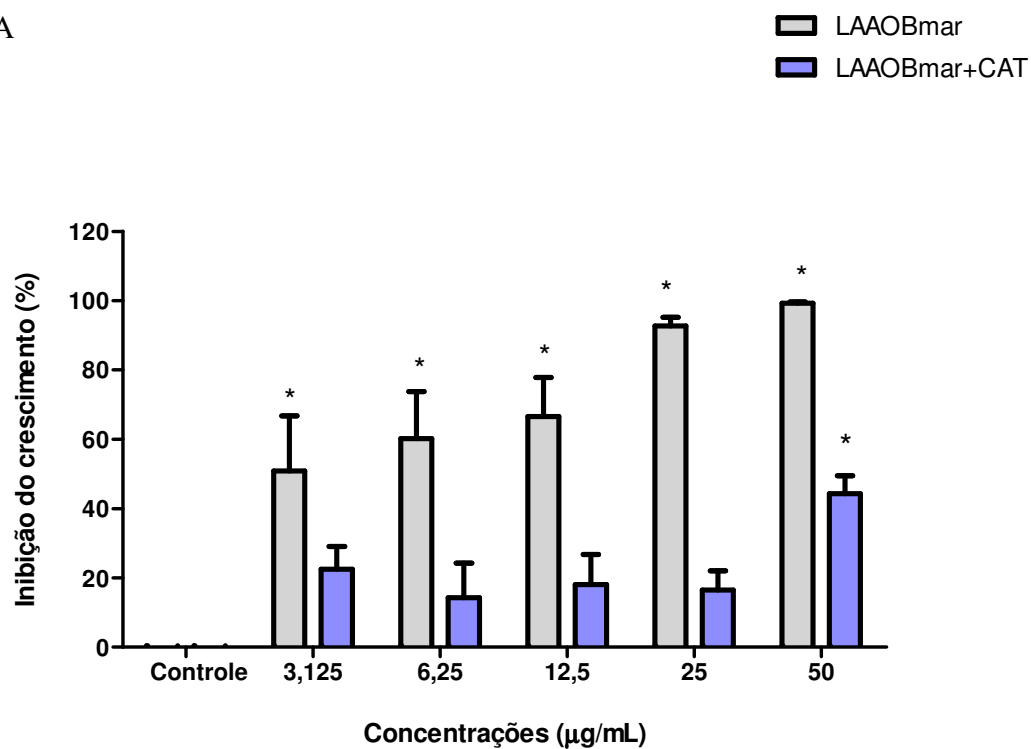
Tabela 4 - Valores de CI_{50} da LAAOBmar e do Benzonidazol com seus respectivos tempos de incubação em culturas de epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Substância	Tempo (horas)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
LAAOBmar	48	6,31
	72	5,85
Benzonidazol	48	19,18
	72	8,23

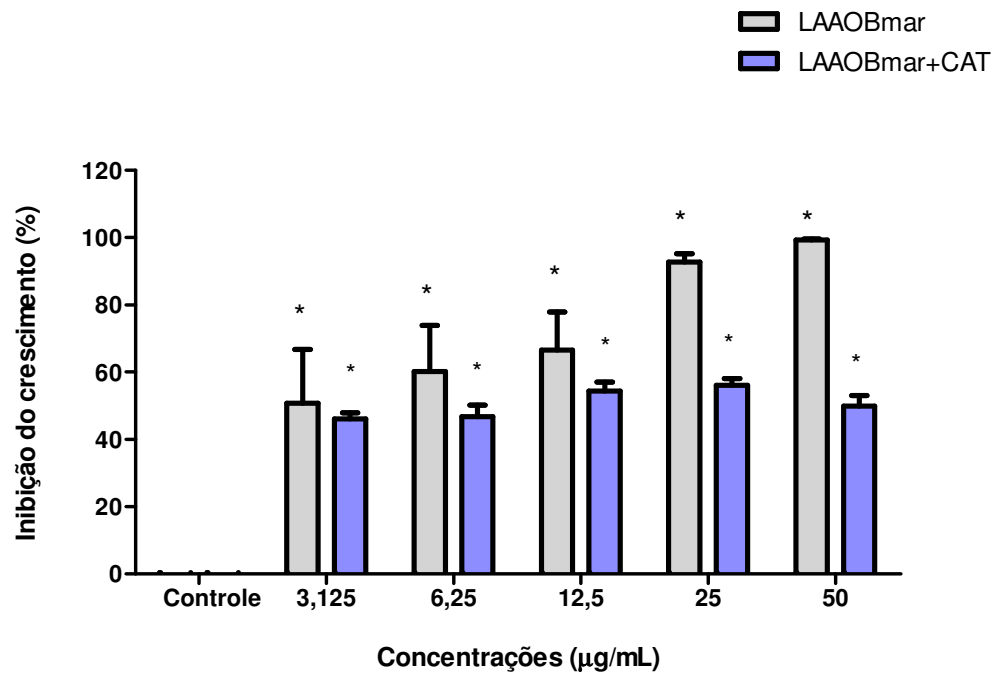
Fonte – Elaborada pela autora

Figura 11 - Efeito citotóxico da LAAOBmar associada ou não a catalase sobre a forma epimastigota de *T.cruzi* após 48 h (A) e 72 h (B) de tratamento.

A



B

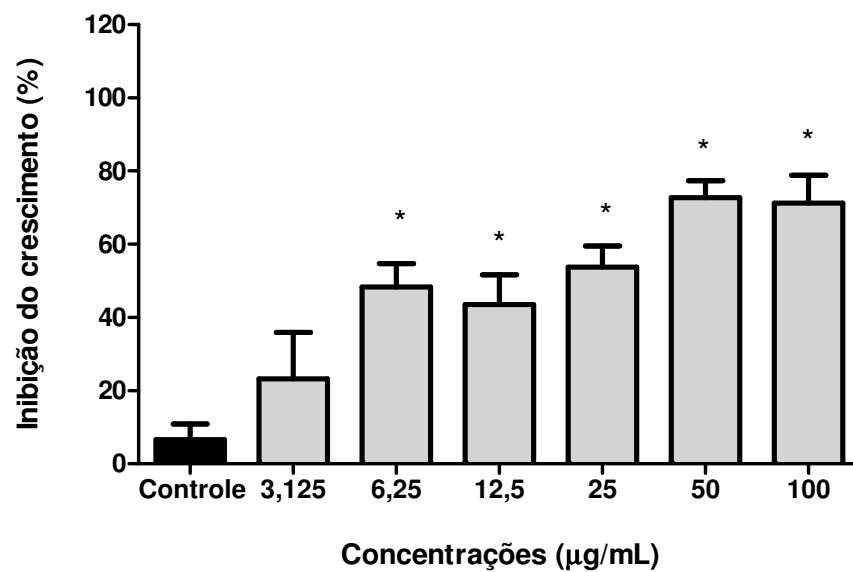


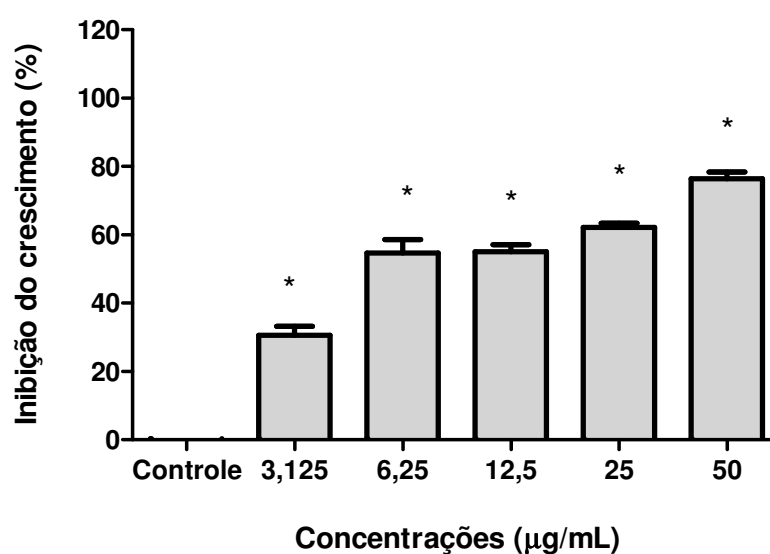
Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: O gráfico representa o percentual de inibição de crescimento dos parasitas (10^6), expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes ($n= 3$). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Dunett, com $*p<0,05$, grupo LAAOBmar e grupo LAAOBmar +CAT comparados ao grupo controle.

Figura 12 - Efeito citotóxico do benznidazol sobre a forma epimastigota de *T.cruzi* após 48 h (A) e 72 h (B) de tratamento.

A





Fonte: Elaborado pela autora

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

Tabela 5: Percentuais de inibição de crescimento das formas epimastigotas tratados com LAAOBmar ou LAAOBmar + CAT após 48 horas de incubação.

Concentração de LAAOBmar (µg/mL)	% de inibição de crescimento	
	Grupo LAAOBmar (média \pm E.P.M)	Grupo LAAOBmar+ CAT (média \pm E.P.M)
3,125	50,79 \pm 16,03	22,49 \pm 6,6
6,25	60,17 \pm 13,6	14,30 \pm 9,9
12,5	66,52 \pm 33,5	18,04 \pm 8,7
25	92,66 \pm 2,6	16,52 \pm 5,5
50	99,30 \pm 0,32	44,26 \pm 5,2

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 6: Percentuais de inibição de crescimento das formas epimastigotas tratados com LAAOBmar ou LAAOBmar + CAT após 72 horas de incubação.

Concentração de LAAOBmar ($\mu\text{g/mL}$)	% de inibição de crescimento	% de inibição de crescimento
	Grupo LAAOBmar (média \pm E.P.M.)	Grupo LAAOBmar+ CAT (média \pm E.P.M.)
3,125	56,44 \pm 13,3	38,67 \pm 1,65
6,25	65,32 \pm 11,4	46,05 \pm 1,78
12,5	75,66 \pm 7,56	54,4 \pm 2,64
25	92,4 \pm 4,1	56,06 \pm 2,02
50	99,75 \pm 0,16	49,92 \pm 3,14

Fonte: Elaborado pela autora

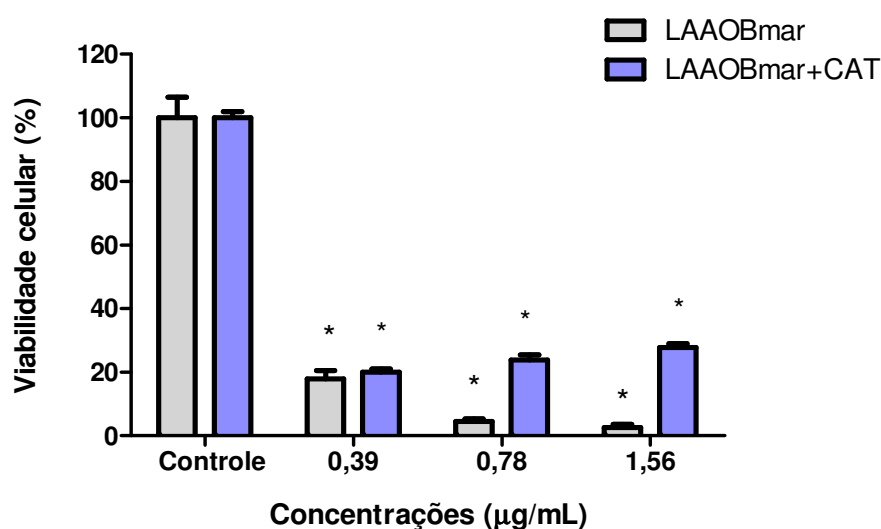
5.2.3 Efeito sobre a viabilidade das formas tripomastigotas

No presente trabalho, foram realizados ensaios de avaliação do efeito da LAAOBmar (0,39 – 1,56 $\mu\text{g/mL}$) sobre a viabilidade das formas tripomastigotas *T. cruzi* cepa Y após o tratamento por 24 horas. De acordo com a FIGURA 13, podemos observar que a substância em estudo possui efeito citotóxico sobre os parasitas nas menores concentrações testadas provendo uma concentração letal para 50% das células (CL_{50}) equivalente a 0,17 $\mu\text{g/mL}$. Tal resultado representa grande importância por esta ser a forma infectante em humanos. Os grupos de tripomastigotas tratados com o fármaco benzonidazol (6,25 - 200 $\mu\text{g/mL}$), testados nas mesmas condições, apresentou $\text{CL}_{50} = 5,39 \mu\text{g/mL}$ (FIGURA 14). Na TABELA 7, podemos conferir as substâncias testadas e os respectivos valores de CL_{50} .

Na avaliação do envolvimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na lise celular, os parasitas foram tratados com LAAOBmar na presença da catalase (CAT; 100 $\mu\text{g/mL}$). Conforme a FIGURA 13 podemos observar que em nenhuma das concentrações avaliadas a

atividade da LAAOBmar foi bloqueada pela presença da catalase no meio de cultura. Na TABELA 8 podemos comparar os percentuais de viabilidade celular das formas tripomastigotas quando tratadas somente com LAAOBmar ou com LAAOBmar + CAT após 24.

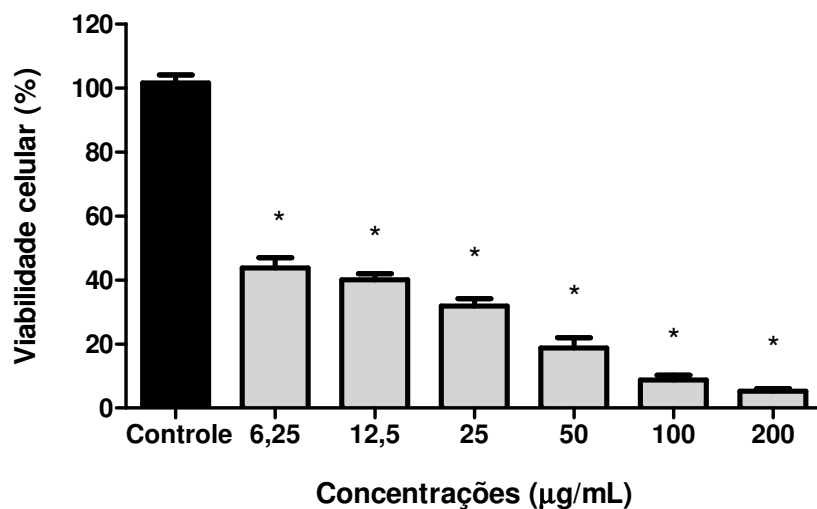
Figura 13 - Efeito citotóxico da LAAOBmar associada ou não a catalase sobre a forma tripomastigotas de *T.cruzi* após 24 h de tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

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

Figura 14 - Efeito citotóxico do benzonidazol sobre a forma tripomastigotasa de *T.cruzi* após 24 h de tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: O gráfico representa o percentual de viabilidade celular, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=2). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Tabela 7 – Valores de CL₅₀ da LAAOBmar e Benzonidazol após 24 h de tratamento em culturas de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Substância	CL ₅₀ (µg/mL)
LAAOBmar	0,17
Benzonidazol	5,39

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 8: Percentuais de viabilidade celular das formas tratados com LAAOBmar ou LAAOBmar + CAT após 24 horas de incubação.

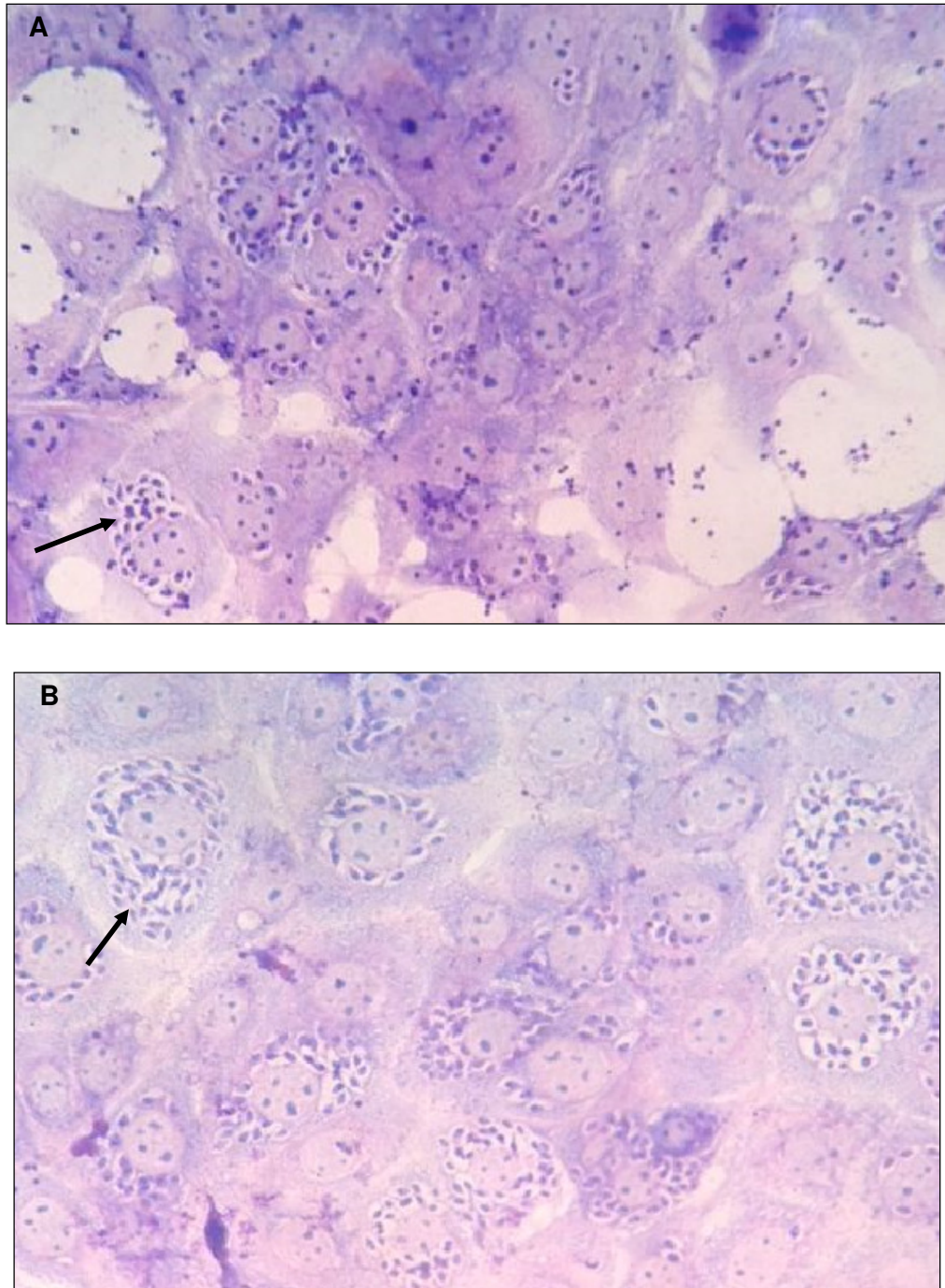
Concentração de LAAOBmar (µg/mL)	% de viabilidade celular Grupo LAAOBmar (média±E.P.M.)	% de viabilidade celular Grupo LAAOBmar+ CAT (média±E.P.M.)
0,39	17,84±2,72	20,03±0,95
0,78	4,5±0,86	23,84±1,63
1,56	2,54±0,96	27,8±1,15

Fonte: Elaborado pela autora

5. 3 Padronização da infecção de células LLC-MK₂ com a forma tripomastigota

Diferentes concentrações de células com variação na proporção de parasitas foram subcultivadas a fim de obter melhor resultado de diferenciação de formas amastigotas. A definição de melhor infecção foi realizada através de observação direta em microscópio óptico diariamente durante 3 dias. Concluímos, através de análise qualitativa, que a infecção mais efetiva ocorreu quando se infectou 5×10^4 células com 5×10^6 tripomastigotas. Na FIGURA 15A visualizamos a presença significativas de formas amastigotas intracelular provenientes da diferenciação de tripomastigotas após 2 dias de infecção e maior quantidade após 3 dias de infecção (FIGURA 15B).

Figura 15 - Fotomicrografia de células LLC-MK₂ (5×10^4) infectada com amastigotas de *T.cruzi* a partir da infecção com tripomastigota (5×10^6) no segundo dia (A) e terceiro dia de infecção (B)



Fonte: Acervo da autora

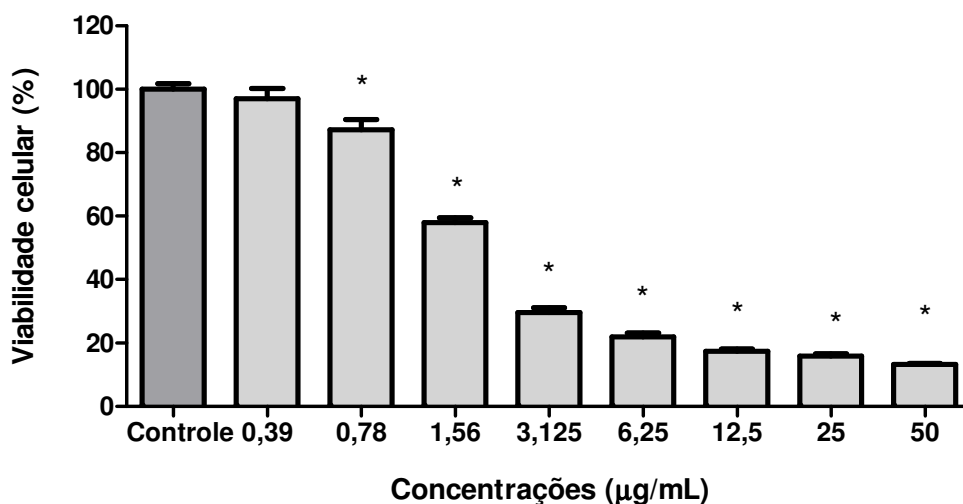
Legenda: As setas indicam as formas amastigotas visualizadas diretamente em microscópio óptico (40x)

5. 4 Avaliação da toxicidade da LAAOBmar sobre as células de mamíferos LLC-MK₂

A partir do resultado obtido na padronização conforme o item 5.3, as células LLC-MK₂ foram então submetidas ao ensaio de citotoxicidade na presença da LAAOBmar. Após 24 horas de tratamento com a LAAOBmar (0,39 – 50 µg/mL), obtivemos uma concentração 50% tóxica (CC₅₀) equivalente a 2,26 µg/mL (FIGURA 16). O resultado do ensaio de citotoxicidade possibilitou a determinação das concentrações a serem testadas nos ensaios sobre as formas intracelulares, garantindo que não haveria prejuízo à célula hospedeira.

A partir do valor de CC₅₀ obtido, foi possível calcular o Índice de Seletividade (SI), que representa a seletividade da substância em estudo ao parasita em relação a célula de mamífero, ou seja CC₅₀ / CL₅₀ (2,26 / 0,17) e obtivemos o valor de 13,29.

Figura 16 – Efeito citotóxico da LAAOBmar sobre a linhagem celular LLC-MK₂ após 24 h de tratamento.



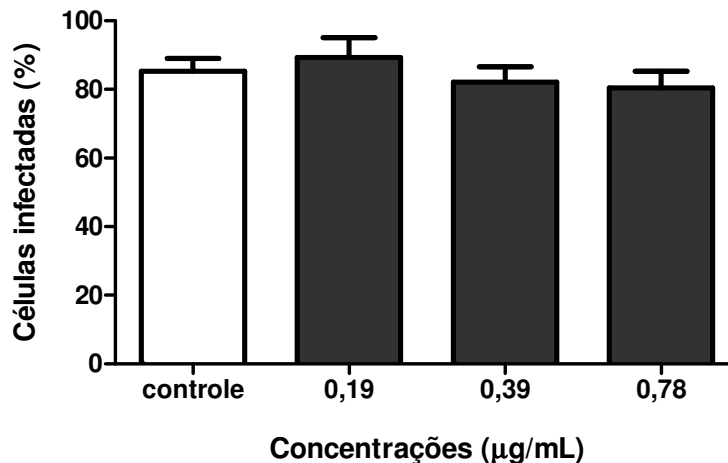
Fonte: Elaborado pela autora

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

5.5 Avaliação da atividade da LAAOBmar em amastigota.

As concentrações de LAAOBmar foram selecionadas como sendo concentrações inferiores da CI_{50} obtida no item anterior 5.4 (0,78, 0,39 e 0,18 $\mu\text{g/mL}$). Nas concentrações testadas, não houve diminuição estatisticamente significativa no percentual de células infectadas (FIGURA 17) nem no percentual de inibição das formas amastigotas (FIGURA 18). A FIGURA 19 representa o índice de sobrevivência (IS) calculado a partir do percentual de células infectadas e do número de amastigotas em cada concentração testada. Fotomicrografias das culturas de células contendo amastigotas pode ser visualizada na FIGURA 20.

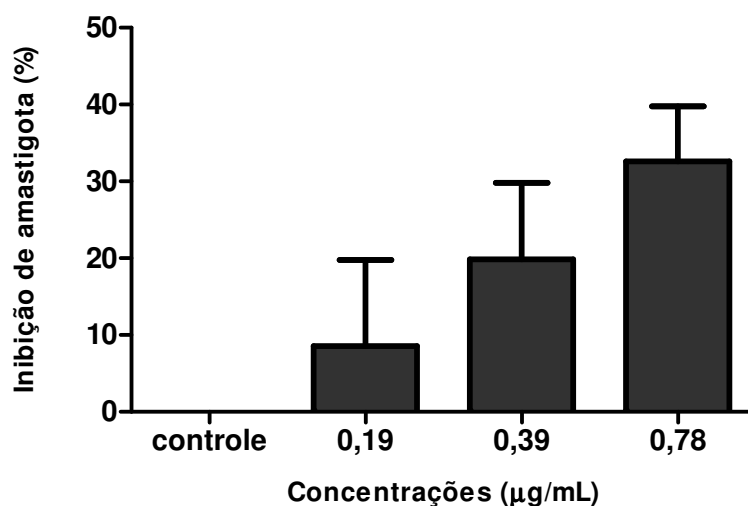
Figura 17 - Efeito da LAAOBmar em células LLC-MK₂ infectadas com amastigotas.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: O gráfico representa o percentual de células infectadas com amastigotas após 24 horas de tratamento, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes ($n=2$). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

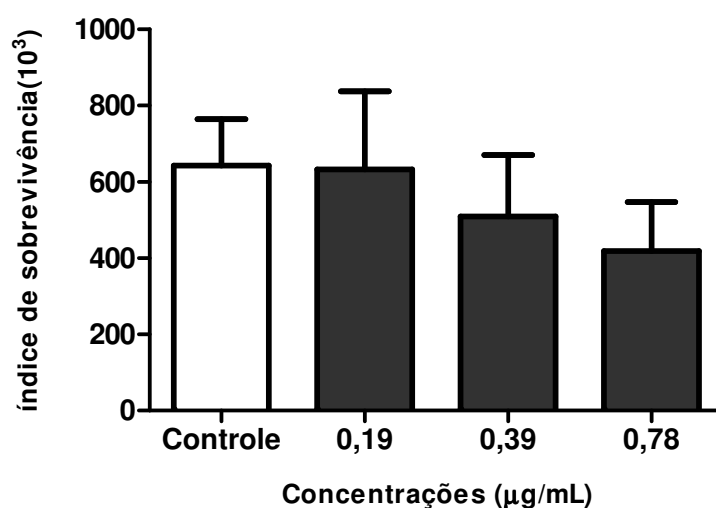
Figura 18 - Efeito da LAAOBmar sobre amastigotas.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: O gráfico representa o percentual de inibição de amastigota intracelular após 24 horas de tratamento, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=2). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

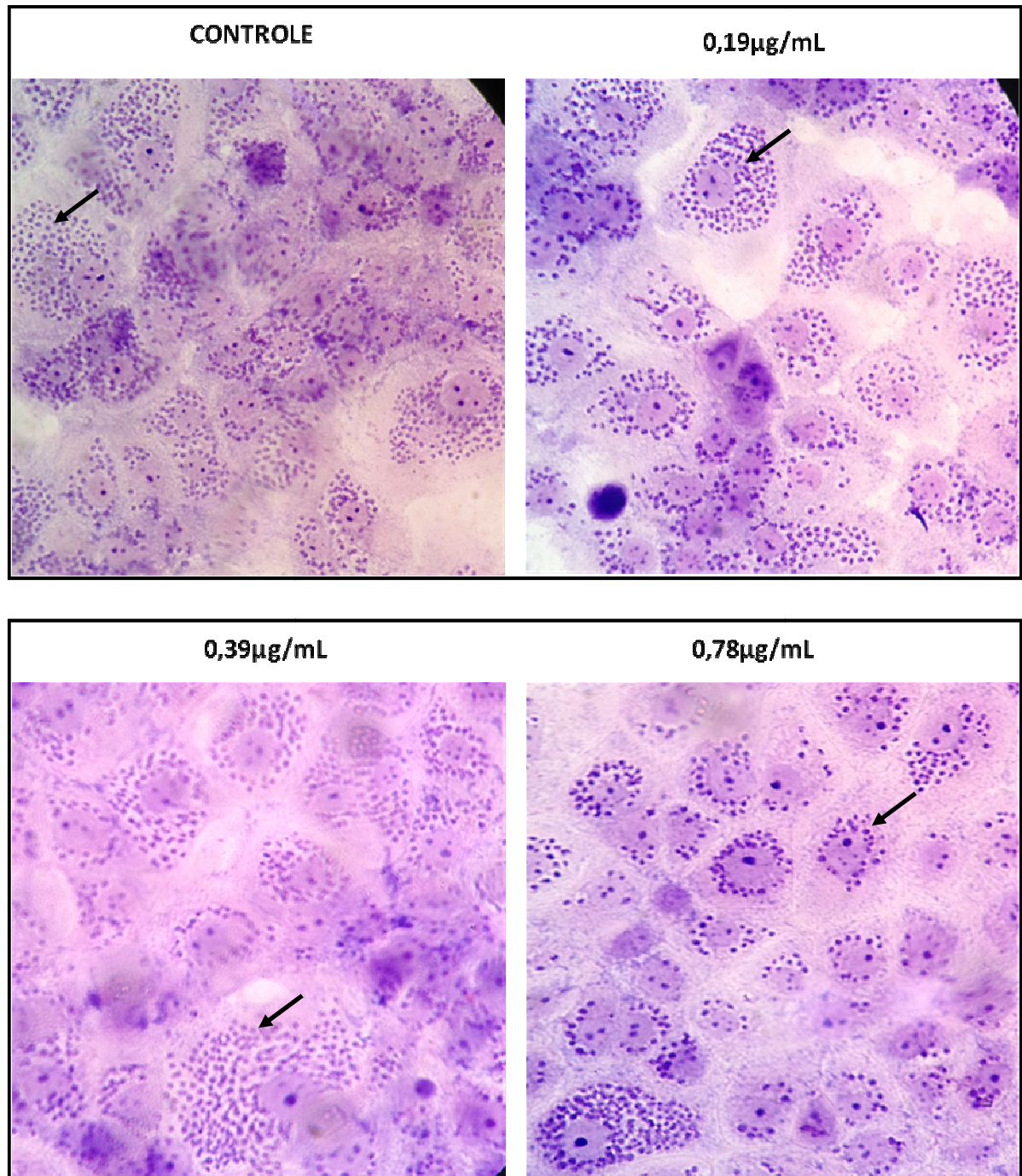
Figura 19 – Efeito da LAAOBmar sobre a sobrevivência dos amastigotas



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: O gráfico representa o índice de sobrevivência após 24 horas de tratamento, expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=2). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Figura 20 – Fotomicrografia de células LLCM-K₂ infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi* tratadas ou não com LAAOBmar.



Fonte: Acervo da autora

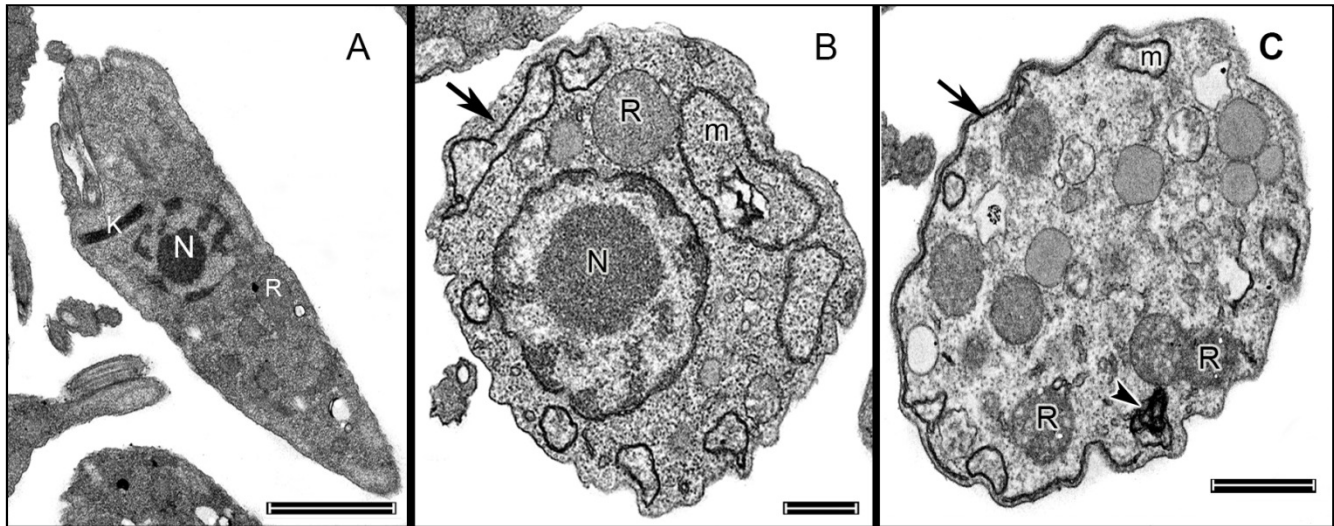
Legenda: As setas indicam as formas amastigotas visualizadas diretamente em microscópio óptico (40x)

5. 6 Avaliações ultraestruturais de *T. cruzi* após o tratamento com LAAOBmar

As análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas nas formas epimastigotas e tripomastiotas de *T. cruzi* após o tratamento por 48 h e 24 h, respectivamente. Foi observado em epimastigotas, que o grupo controle apresentava corpo alongado, organelas e membranas intactas e sem alterações no citoplasma e reservossomo pode ser visualizado na parte posterior do parasita FIGURA 21A. O tratamento com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de LAAOBmar por 48 horas, causou perda da organização celular, com deslocamento das organelas como reservossomos e retículo endoplasmático FIGURA 21B. Entretanto, poucas células apresentaram perda dos constituintes citoplasmáticos ou ruptura de membrana, mesmo na maior concentração avaliada FIGURA 21C. Um intenso inchaço das organelas como mitocôndria e retículo endoplasmático pode ser observado tanto em epimastigota e tripomastigota. Interessantemente, um aumento da eletrodensidade das membranas mitocondriais foi observado na maioria dos epimastigotas.

Os tripomastigotas tratados com $0,17 \mu\text{g/mL}$ de LAAOBmar, mostraram mitocôndria alterada, ruptura de k-DNA, aumento do perfil membranoso no citoplasma, que aparenta ser derivado da membrana plasmática e ou do reticulo endoplasmático FIGURA 22B-C. Além disso, intumescimento do corpo celular também foram observados. Parasitas tratados com o dobro da concentração foram totalmente destruídos, não sendo possível o processamento de material.

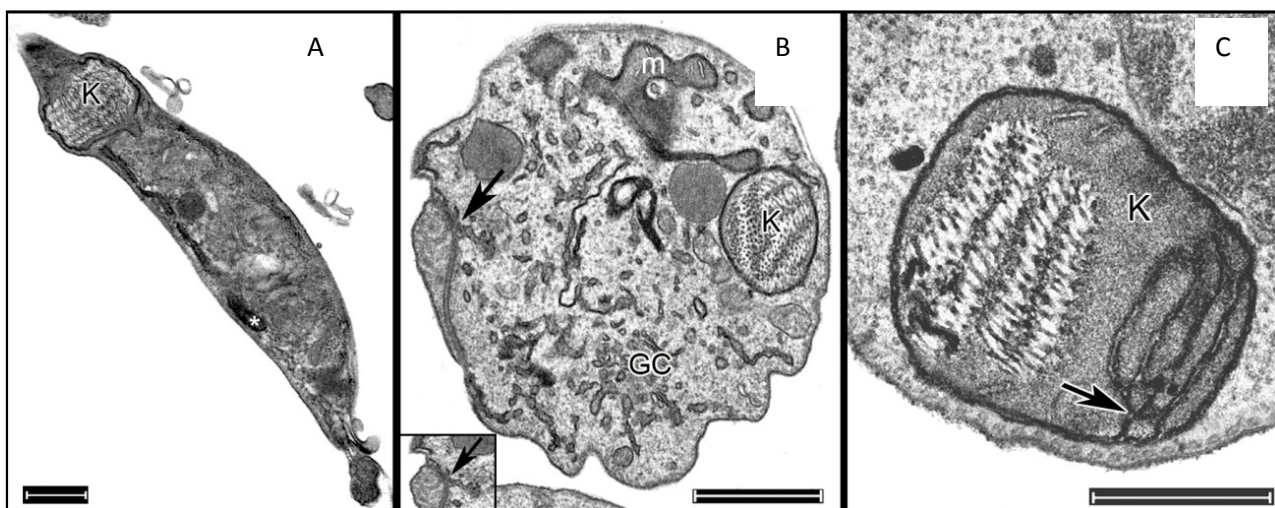
Figura 21 - Efeito da LAAOBmar na ultraestrutura de epimastigotas de *T.cruzi* analisado por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Acervo da autora

Legenda: (A) Células controle apresentando corpo celular alungado com núcleo localizado centralmente, um citoplasma homogêneo e membrana plasmática intacta. (B) Forma epimastigota mostrando corpo celular e mitocôndria entumescidos (m) e membrana ondulada. Nota-se um aumento na eletrodensidade da membrana mitocondrial (seta). (C) Forma epimastigota tratada com $2 \times IC_{50}$ de LAAOBmar, apresentando um evidente inchaço do retículo endoplasmático (seta) e da mitocôndria (m) com maior densidade de elétrons. Nota-se a presença de reservosomos intumescidos (R) dispersos por todo o citoplasma e a presença de figuras de mielina (seta). Bars: A = 2 μm ; B = 0.5 μm ; C = 1 μm .

Figura 22– Efeito da LAAOBmar na ultraestrutura de tripomastigotas analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Acervo da autora

Legenda: (A) Célula controle apresentando cinetoplasto (k) e mitocôndria (*) bem preservados. (B) Detalhe da forma tripomastigota tratado com CL₅₀ da LAAOBmar apresentando corpo celular e organelas entumescidos. Fragmentação do complexo de Golgi (GC), estruturas tubulares e vesículas podem ser visualizadas. Observe a presença de perfil membranoso decorrente da membrana plasmática (seta, detalhe). (C) Magnitude do cinetoplasto com fragmentação da rede de k-DNA e anastomoses alteradas (seta). Bars: A–B = 1 µm; C = 0.5 µm.

5. 7 Efeito da LAAOBmar sobre a integridade da membrana e efeito no potencial apoptótico em epimastigotas analisados por citometria de fluxo

A avaliação do efeito da LAAOBmar foi realizada através de células tratadas ou não (controle) com LAAOBmar (3,15µg/mL) na presença e ausência de catalase (100 µg/mL) marcadas com iodeto de propídio e anexina V- FITC. O iodeto de propídio (IP) é um marcador que se liga ao DNA celular ao penetrar em células com alterações na integridade da membrana, uma vez que esta substância não possui a capacidade de permear membranas intactas. O marcador anexina V- FITC possui afinidade a fosfatidilserina, um lipídio de membrana localizado no interior dessa estrutura em células normais, porém, em células em apoptose é externalizado.

Conforme a FIGURA 23, o tratamento com LAAOBmar demonstrou uma discreta marcação de parasitas para IP e anexina V-FITC. De modo semelhante, células tratadas com LAAOBmar na presença de CAT, também não apresentaram marcação estatisticamente significativa em relação ao controle. Os valores em percentual de eventos positivos podem ser visualizados na TABELA 9.

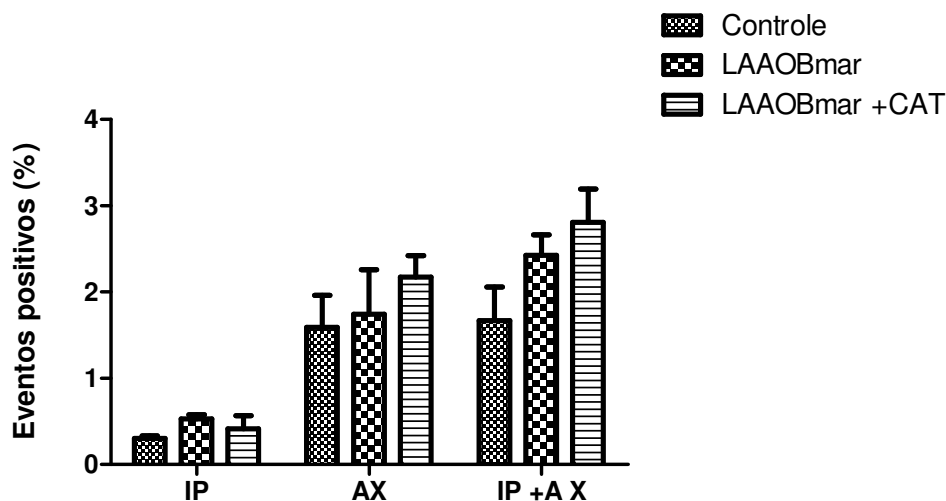
Tabela 9: Percentual de eventos positivos após a marcação com iodeto de propídio (IP) e anexina V- FITC (AX), analisados por citometria de fluxo.

	AX – IP+ (%)	AX + IP- (%)	AX + IP+ (%)
Controle	0,3	1,59	1,67
LAAOBmar	0,53	1,74	2,42
LAAOBmar+CAT	0,4	2,17	2,81

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: As amostras foram marcadas simultaneamente com iodeto de propídio e anexina V-FITC e os resultados apresentados como parasitas marcados somente por IP (AX – IP+), por AX (AX+ IP-) e duplamente marcados (AX + IP+).

Figura 23 – Efeito da LAAOBmar (3,12 µg/mL) na presença ou ausência da catalase (CAT, 100 µg/mL) em epimastigotas.



Fonte : Elaborado pela autora

Legenda: O gráfico representa o percentual de eventos positivos após a marcação com iodeto de propídio (IP) e anexina V- FITC (AX) analisados por citometria de fluxo expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=2). Análise estatística foi realizada por Teste *t* – *Student* não pareado com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

5. 8 Efeito da LAAOBmar sobre a integridade da membrana e da mitocôndria de epimastigota analisados por microscopia de confocal

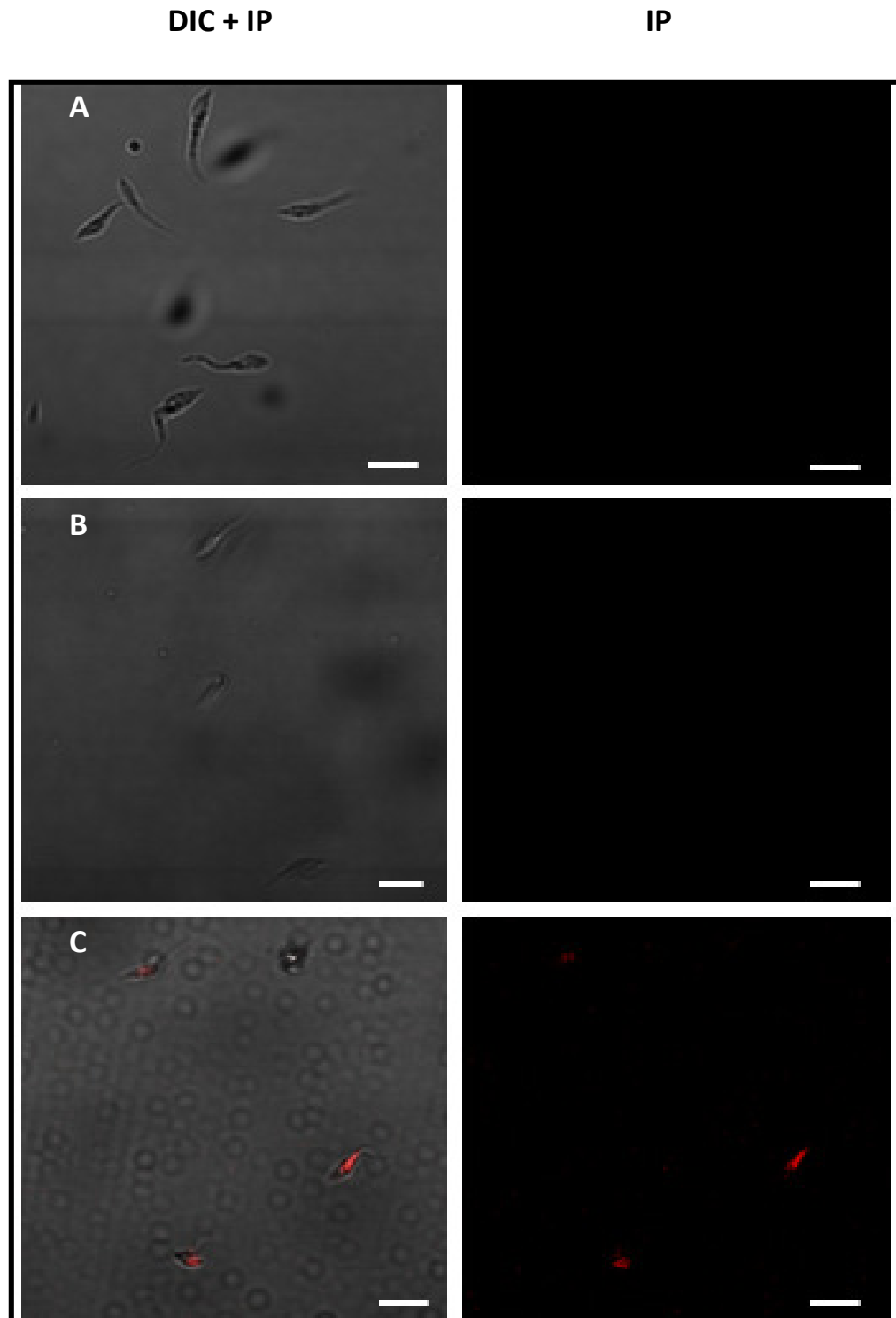
As avaliações por microscopia de confocal auxiliaram a identificar as alterações fisiológicas e morfológicas ocorridas nos parasitas após tratamento com LAAOBmar. As culturas foram marcadas com iodeto de propídio (IP), para análise de integridade de membrana e com rodamina 123 (Rod 123) para avaliação do potencial da membrana mitocondrial.

Na FIGURA 24 observamos que os parasitas do grupo não tratado (controle) apresentavam morfologia característica da forma em estudo (corpo e flagelo alongados) e sem emissão de fluorescência. De forma semelhante ao grupo controle, os parasitas tratados com

3,15µg/mL de LAAOBmar, demonstraram discretas alterações morfológicas e ausência de marcação por IP, portanto, mantendo a integridade da membrana na concentração testada. Foi observado que na maior concentração de LAAOBmar (6,31µg/mL), os parasitas apresentaram diminuição de tamanho do corpo e todos apresentaram marcação positiva de IP.

A marcação dos parasitas com Rod 123 pode ser conferida na FIGURA 25, em que se observa que nos grupos controle a morfologia está inalterada e há a ocorrência da emissão de fluorescência resultante da atividade normal do potencial de membrana mitocondrial. Epimastigotas na presença de 3,15µg/mL de LAAOBmar demonstraram drásticas alterações no corpo e flagelo, porém, a atividade mitocondrial permanece inalterada. O efeito com maior relevância foi observado no grupo tratado com 6,31µg/mL, em que foram visualizadas alterações morfológicas intensas e quase ausência de fluorescência.

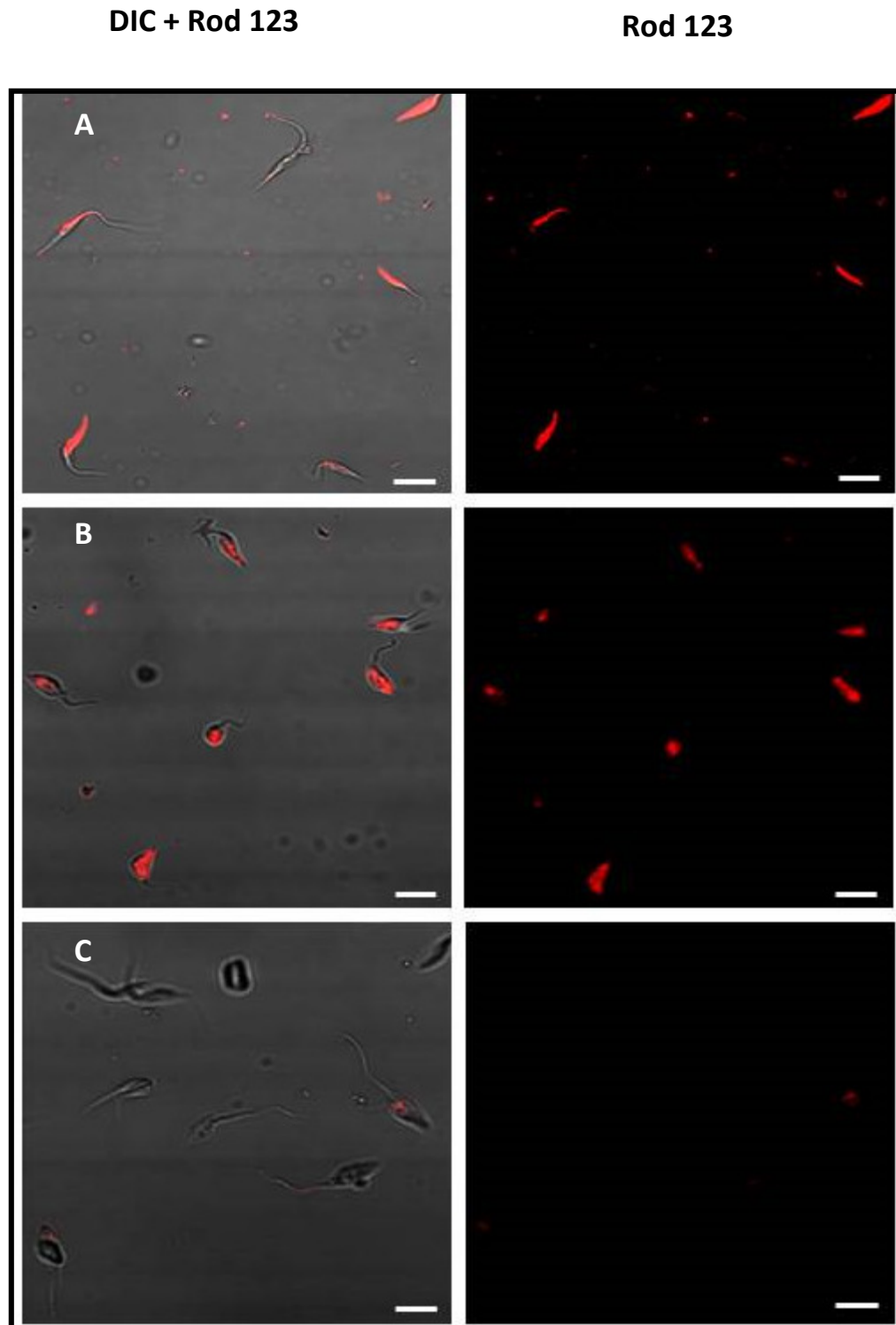
Figura 24 – Efeito da LAAOBmar sobre a integridade da membrana de epimastigotas analisado por microscopia confocal



Fonte: Acervo da autora

Legenda: As imagens foram obtidas a partir do canal correspondente a fluorescência do iodetoto propídio (IP) e por sobreposição de imagens de contraste interferencial (contraste de interferência diferencial, DIC) e IP (IP + DIC) analisados por microscopia confocal após 48 horas de incubação. (A) representa os parasitas sem tratamento, (B) os parasitas tratados com LAAOBmar (3,15 µg / ml) e (C) tratados com parasitas LAAOBmar (6,31 µg / ml). Barras: 10 µm

Figura 25– Efeito da LAAOBmar sobre o pontencial da membrana mitocondrial de epimastigotas analisado por microscopia de confocal



Fonte: Acervo da autora

Legenda: As imagens foram obtidas a partir do canal correspondente a fluorescência do rodamina 123 (Rod 123) e por sobreposição de imagens de contraste interferencial (contraste de interferência diferencial, DIC) e Rod 123 (Rod 123 + DIC) analisados por microscopia confocal após 48 horas de incubação. (A) representa os parasitas sem tratamento, (B) os parasitas tratados com LAAOBmar (3,15 µg/ml) e (C) tratados com parasitas LAAOBmar (6,31 µg/ml). Barras: 10 µm

6 DISCUSSÃO

As doenças parasitárias continuam sendo um desafio para muitos países, afetando o desenvolvimento social e econômico. A doença de Chagas causa anualmente 6 mil mortes no Brasil (Dias, 2007; Martins-Melo *et al.*, 2012) e o aumento do número de casos em áreas não endêmicas está gerando preocupação em países da Europa e nos Estados Unidos. Além disso, a alta toxicidade e eficácia limitada das drogas atualmente utilizadas no tratamento torna o desenvolvimento de novos componentes terapêuticos uma necessidade (Martins-Melo, 2014).

Produtos de origens naturais, tais como venenos de animais, ocupam um espaço no arsenal de moléculas bioativas. Estas substâncias representam a principal fonte de agentes terapêuticos contra bactérias, fungos e parasitas (Altmann, 2001). Desta forma, os venenos de serpentes vêm se tornando importantes fornecedores de componentes alternativos e efetivos contra doenças negligenciáveis ou com terapias limitadas (Ande *et al.*, 2006).

As toxinas isoladas de venenos de diferentes famílias de serpentes são descritas por possuírem uma diversidade de propriedades biológicas e comumente utilizadas como ferramentas para design de novos agentes terapêuticos. De acordo com Fox (2013), os venenos ofídicos são constituídos por aproximadamente 11 famílias de proteínas biologicamente ativa. São identificadas: fosfolipases A₂, proteinases serinas, metaloproteases, peptídios vasoativos, lectinas, desintegrinas, fatores de crescimento endotelial, nucleotidases, hialuronidases, fosfodiesterases e L-aminoácido oxidases. Inserida nesse grupo, as L-aminoácido oxidase (LAAOs) tem sido identificada em vários venenos de serpentes representando até 30% do veneno total (Takasuka *et al.*, 2001) e 1-9% do total das proteínas dos venenos das famílias *Viperidae*, *Crotalidea* e *Elapidea*, proporcionando diferentes efeitos biológicos.

As LAAOs são altamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas em diversos organismos, como: venenos ofídicos, bactérias, fungos e algas. Do ponto de vista bioquímico, LAAOs de diferentes fontes distingue-se pela massa molecular, especificidade de substrato, modificações e regulação pós-traducionais (Pollegioni *et al.*, 2013). Dentre as LAAOs existentes, as de origem ofídicas são as mais estudadas por proporcionar diferentes atividades biológicas, tais como, atividade antibacteriana, leishmanicida, tripanocida e inibição da agregação plaquetárias.

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, avaliamos a atividade da LAAO isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* sobre a *Leishmania chagas* e *Leishmania amazonensis* (Costa Torres *et al.*, 2010) obtendo resultados eficientes na inibição de crescimento de tais parasitas.

Nesse contexto, nosso estudo teve o objetivo de investigar a ação antiparasitária da LAAOBmar em diferentes formas do parasita do *Trypanosoma cruzi* cepa Y (epimastigota, tripomastigota e amastigota), avaliando o possível mecanismo de ação e de morte celular e avaliação de modificações morfológicas através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, citometria de fluxo e microscopia de confocal.

Nossos resultados mostraram que a LAAOBmar inibiu fortemente as formas epimastigotas (forma proliferativa residente no vetor) após 48 e 72 horas de incubação quando comparado com as LAAOs isoladas do veneno da *Bothrops jararaca* (Deolindo *et al.*, 2010) e do veneno da *Bothrops leucurus* (Torres *et al.*, 2010), sendo esta última ausente de ação contra formas epimastigota de *T. cruzi*. Outros autores mostram que as LAAOs isoladas das espécies de *Bohtrops* possuem atividade contra *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (Alves-Paiva *et al.*, 2011; Ciscotto *et al.*, 2009; Costa Torres, *et al.*, 2010; Stábili *et al.*, 2007).

Embora estas moléculas demonstrem propriedades bioquímicas similares, podem variar em tipo de substrato (Ciscotto *et al.*, 2009; Du e Clemetson, 2002) o que pode explicar as diferença nas atividades biológicas de LAAOs provenientes de venenos da mesma família. Além disso, de acordo com Lukasheva e colaboradores (2011), essa ampla gama de funções biológicas está associada com as reações de diferentes organismos frente à presença da enzima LAAO.

A forma tripomastigota de *T. cruzi* (forma infectante não proliferativa), foi consideravelmente mais suscetível ao tratamento da LAAOBmar que as formas epimastigotas. O efeito inibitório sobre tripomastigota também foi mais eficiente que a droga de referência Benzonidazol, sendo esse resultado de grande importância uma vez que esta é a forma infectante em humanos. De forma semelhante, LAAOs do veneno da *B. jararacussu* e *B. moojeni* apresentaram alto efeito tripanocida (França *et al.*, 2007). Em contraste, LAAOs da *B. atrox* e *Lachecis muta* revelaram resistência ou baixa citotoxicidade frente à mesma forma do parasita (Alves-Paiva *et al.*, 2011; Bregge-Silva, *et al.*, 2012).

Reafirmando os achados na forma epimastigota, estes diferentes efeitos de LAAOs de venenos de serpentes (LAAOSV) podem estar relacionados com a especificidade do substrato da enzima e os sítios de ligação ou devido à variação interespecie (Guo *et al.*, 2012; Lee *et al.*,

2014; Wei *et al.*, 2009). Esta diferença na especificidade das LAAOS de diferentes espécies tem sido atribuída na diferença da estrutura primária da enzima (Jin *et al.*, 2007).

A citotoxicidade de LAAOs é atribuída em grande parte à produção de peróxido de hidrogênio como um resultado da desaminação dos L-aminoácidos (Calderon *et al.*, 2014). De acordo com Ande e colaboradores (2006), o peróxido de hidrogênio é produzido no meio extracelular e pode agir diretamente na membrana plasmática por alteração da permeabilidade. Estudos indicam ainda que esta espécie reativa de oxigênio aumenta o estresse oxidativo ativando por choque térmico as proteínas e iniciando uma desorganização da membrana e do citoplasma da célula afetada (Guo *et al.*, 2012).

Portanto, conduzimos o nosso trabalho a investigar o possível mecanismo de morte celular induzida pela LAAOBmar contra os parasitas de *T. cruzi* através do envolvimento do H_2O_2 . Nos ensaios com as formas epimastigotas a presença da catalase, uma enzima que age como eliminadora de H_2O_2 , atenuou significativamente o efeito antiparasitário da LAAOBmar, porém, não aboliu completamente. De acordo com nossos resultados, o efeito tripanocida após 48h de tratamento na presença da catalase foi consideravelmente diminuído, diferentemente do efeito ocorrido nos grupos com 72 horas de incubação. Assim, sugerimos que o a produção de H_2O_2 ocorre conforme a disponibilidade de substrato no meio e possivelmente ocorra um acúmulo de peróxido.

Inversamente ao epimastigota, os efeitos da LAAOBmar sobre a viabilidade de tripomastigota não foram significativamente revertido pela catalase. A alta suscetibilidade dos tripomastigotas às injúrias induzidas por H_2O_2 quando comparadas com epimastigotas, tem sido reportado em outros estudos. Peloso e colaboradores (2011) demonstraram que as formas tripomastigotas não sobrevivem em concentrações de H_2O_2 maior do que 50 μM enquanto que epimastigotas pode lidar com o estresse induzido por H_2O_2 em concentrações até 200 μM (Gadelha *et al.*, 2013).

Encontramos na literatura estudos que em sua maioria correlaciona o efeito antiparasitário das LAAOSV pela presença de H_2O_2 liberado, como a atividade da LAAO da *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. atrox* (Alves-Paiva *et al.*, 2011; Ciscotto *et al.*, 2009; Deolindo *et al.*, 2010; Stábili *et al.*, 2007). O efeito bactericida da *B. moojeni*, *B. pauloensis*, *B. jararaca* (Ciscotto *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009; Stábili *et al.*, 2007) também é descrito. Nesses estudos, a adição da enzima catalase em grupos tratados com LAAOSVs, a morte celular foi diminuída ou completamente abolida, sugerindo o envolvimento direto de H_2O_2 .

Por outro lado, outros relatos sugerem que a atividade da enzima pode não ser totalmente devido a produção de H_2O_2 (Ande *et al.*, 2006, Suhr e Kim, 1999), o que foi

observado em nosso trabalho e na pesquisa com a *B. pauloensis* contra o parasita *L. braziliensis* (Rodrigues *et al.*, 2009). A falha da catalase em reverter os efeitos deletérios da LAAOBmar sobre tripomastigota corrobora com essa hipótese. Além disso, a citotoxicidade bem conhecida de amônia (Zeuthen *et al.*, 2006), um outro sub-produto da atividade da LAAO, poderá também contribuir para o efeito deletério do LAAOBmar em *T. cruzi*.

Alguns autores sugerem que existam receptores ou alvos celulares específicos, embora o mecanismo molecular desses efeitos ainda seja desconhecido (Li *et al.*, 2008; Stábéli *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004a). Outros trabalhos descrevem que as LAAOSVs podem se ligar à superfície celular e gerar H₂O₂ localmente ou internamente na célula, ação inviável para a enzima catalase (Surh and Kim 1999; Ali *et al.* 2000). Esses diferentes resultados do possível mecanismo de ação da LAAOSVs corroboram com as descrições a respeito da variação da enzima dentro da mesma espécie e a existência de isoformas dessa molécula. Esta diferença na especificidade das LAAOS de diferentes espécies tem sido atribuída na diferença da estrutura primária (Jin *et al.*, 2007).

Para dar continuidade aos ensaios da atividade antiparasitária da LAAOBmar, foi avaliado também o efeito sobre as formas amastigotas. Inicialmente, foi realizada a padronização da infecção das células mamíferas LLC-MK₂ infectadas com tripomastigotas. Foi definida então a razão de infecção (tripomastigotas por células) e tempo de infecção para ocorrer a diferenciação em amastigota e dessa forma realizar o tratamento com LAAOBmar. Nossos resultados mostraram que após 24 de infecção já foi possível identificar a presença das formas intracelulares. Em seguida, avaliamos o efeito tóxico da LAAOBmar em células LLC-MK₂ para selecionar doses sub tóxicas às células mamíferas nos ensaios de amastigota. Com o resultado de citotoxicidade foi possível calcular o índice de seletividade (SI) para a forma tripomastigota, que apresentou um alto valor, ou seja, a LAAO em estudo é mais seletiva ao tripomastigota. Valores acima de 10 (SI > 10) são geralmente considerados indicativo de seletividade (Gallé *et al.*, 2013).

De forma a concluir nosso estudo da atividade da LAAOBmar sobre o parasita do *T. cruzi* nos diferentes níveis do ciclo celular, nós realizamos os ensaios em formas amastigotas intracelular (forma infectante e proliferativa). Os experimentos com LAAOBmar contra os amastigotas intracelulares mostraram que o percentual de células infectadas não foi alterado e o percentual de inibição de amastigotas e o índice de sobrevivência foram moderadamente diminuídos, mas não estatisticamente significativa. Portanto, foi evidenciada uma tendência à diminuição da multiplicação dos amastigotas.

Estes resultados poderiam ser explicados pelo curto tempo de incubação do fármaco (24 horas) usada nos experimentos. É possível que um maior tempo de incubação seja necessário para que a LAAOBmar exerça seus efeitos deletérios sobre amastigota intracelular, uma vez que esta forma evolutiva do parasita é de alguma forma protegido dentro do vacúolo parasitóforo (Adade *et al.*, 2011;. Urbina e Docampo, 2003).

Outra hipótese a ser questionada é que o parasita intracelular pode possuir resistência à presença de radicais livres e peróxido de hidrogênio de forma diferente às formas circulantes sanguíneas tripomastigota. Além disso, Timm e colaboradores (2014) evidenciaram atividade de diaminas frente às formas tripomastigotas e menor efeito sobre amastigotas de *T. cruzi*. De acordo com os autores, essa diferença de efeito entre as duas formas estudadas pode ser devido a: (a) distinto mecanismo de captação/extrusão e (b) diferentes alvos celular das duas formas avaliadas.

A identificação e caracterização das alterações morfológicas e fisiológicas induzidas por LAAOBmar em *Trypanosoma cruzi*, que conduz a morte ao parasita, pode nos auxiliar a identificar os alvos moleculares destas drogas. A morte celular programada (*Programmed Cell Death*, PCD) é caracterizadas por modificações morfológicas e bioquímicas (Damasceno *et al.*, 2014). A PCD tipo I, denominada morte por apoptose, tem como principais características a retração do citoplasma, fragmentação de DNA, condensação da cromatina, aumento da mitocôndria, ativação das caspases e externalização da fosfatidilserina (Adade *et al.*, 2013; Benitez *et al.*, 2012). A morte celular por autofagia é denominada PCD tipo II, em que ocorre uma complexa via de sinalização com alterações morfológicas como formação de autofagossomos e figuras de mielina no citoplasma (Adade *et al.*, 2013; Kessler *et al.*, 2013). O último tipo de morte celular ocorrida em parasitas é o PCD tipo III, morte por necrose. Nesse tipo de evento a célula entra em processo de destruição de forma mais abrupta, com intensas alterações mitocondriais, depleção de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio, vacuolização citoplasmáticas e perda da membrana plasmática (Benitez *et al.*, 2012). O conhecimento a cerca do caminho de morte do parasita pode contribuir nos estudos sobre os eventos celulares no estabelecimento da infecção e fornecer respostas de quando e por que estes eucariontes unicelulares morrem de forma controlada (Ameisen, 2002; Pollitt *et al.*, 2010).

Diferentes técnicas têm sido empregadas no estudo da morte celular do *T. cruzi* como análises ultraestruturais, citometria de fluxo, microscopia de fluorescências (Alvarez *et al.*, 2008; Jimenez *et al.*, 2008).

De forma a aprofundar nossos achados os parasitas de *T.cruzi*, formas epimastigota e tripomastigota foram submetidos às análises das modificações morfológicas e na organização ultraestrutural após o tratamento com LAAOBmar. A utilização da microscopia eletrônica vem sendo utilizada como importante ferramenta para identificar estruturas celulares de alvos intracelulares de drogas com isso, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) nos fornece imagens estruturais de membranas e organelas celulares (Adade *et al.*, 2010).

Embora os efeitos da LAAOBmar foram mais pronunciados no tripomastigota do que em epimastigotas, ambas as formas evolutivas apresentaram alterações morfológicas semelhantes. As modificações ultraestruturais mais proeminentes observadas em epimastigotas tratados com LAAOBmar foram a perda da organização celular e da polaridade, com um deslocamento de organelas como o reservosomos e retículo endoplasmático. Um aumento da eletrondensidade das membranas mitocondriais foi observado na maioria das células epimastigotas. Este efeito pode ser devido a um aumento da síntese de lípidos da membrana em resposta ao estresse mitocondrial, levando a uma intensificação da reatividade da membrana mitocondrial ao tetróxido de ósmio utilizado no procedimento de fixação (Khan *et al.*, 1961).

Tem sido demonstrado que as condições que resultam na perda da homeostase celular, incluindo o estresse oxidativo, o estresse do retículo endoplasmático e perturbações mitocondriais podem desencadear os mecanismos de controle destinados a restabelecer a função celular e viabilidade. Entre esses mecanismos, a autofagia medeia a degradação coordenada de organelas e moléculas danificadas numa tentativa para restaurar a homeostase celular (Baixauli *et al.*, 2014).

Durante o processo de autofagia uma membrana de isolamento ou fagoforo, envolve uma porção do citoplasma contendo organelas e moléculas residentes. O fagoforo fecha sobre si mesma para formar o autofagossomo, que, por sua vez, evolui a autofagossomo maduro antes de fundir-se com os lisossomos para degradação do material isolado (Burman e Ktistakis, 2010). Há um consenso de que o retículo endoplasmático e outras organelas como Golgi, endossomos e membrana plasmática são as principais fontes de membrana autofagossomal (Tooze, 2013). As alterações ultra-estruturais descrito, principalmente em tratamentos com baixas concentrações de LAAOBmar, sugerem fortemente que a autofagia teve participação. No entanto, é possível que a falha da autofagia ao lidar com o estresse oxidativo persistente, induzida pelas concentrações mais elevadas de LAAOBmar, pode conduzir à morte do parasita. Tripomastigotas tratados com maior concentração de LAAOBmar foi completamente destruídos, corroborando com esta ideia.

Nas formas tripomastigotas, a LAAOBmar induziu severas alterações morfológicas: presença de vacúolos, formação de figuras mielina-like e destruição do complexo de Golgi, alterações na mitocôndria, como o aumento de volume e alteração na rede de kDNA. Hailey e colaboradores (2010) descrevem que a presença de figuras de mielina em contato próximo com a mitocôndria pode indicar danos de membrana mitocondrial por mitofagia. Embora algumas mudanças morfológicas encontradas em tripomastigotas foram comuns às encontradas em epimastigotas, não podemos descartar outras possibilidades de mecanismos diferente de necrose, como autofagia e apoptose. Alguns estudos descrevem diferentes mecanismos de morte nos parasita *T. cruzi*, como o veneno da *Apis mellifera* e sua fração melitina (Adade *et al.*, 2013; Adade *et al.*, 2012), que induz autofagia em epimastigota e apoptose em tripomastigota.

Dando continuidade aos estudos de avaliação do tipo de morte celular, epimastigotas de *T. cruzi* foram tratados com LAAOBmar e marcados com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) para seguida avaliação em citômetro de fluxo. O marcador anexina V-FITC avalia a externalização da fosfoditilserina, um lipídio de membrana que durante o processo apoptótico é translocado para a camada externa da membrana. Enquanto que o IP somente consegue marcar células com membranas alteradas, característica de ocorrência de necrose. Nossos resultados mostraram reduzida marcação por ambas as substâncias, porém, sugerimos que há uma inclinação de ocorrência de células duplo marcadas e coradas com IP nos grupos tratados com LAAOBmar. Salientamos que as análises ultraestruturais indicaram um possível rompimento de membrana.

De acordo com alguns autores, o peróxido de hidrogênio é capaz de induzir diferentes tipos de morte celular em epimastigota de *T. cruzi* de maneira dose-dependente (Deolindo *et al.*, 2010; Piacenza *et al.*, 2001; Vilchez *et al.*, 2011). Em estudos realizados com LAAO do veneno da *Colloselasma rhodostoma* em células Jurkat, Ande e colaboradores (2006), demonstraram que a presença de H₂O₂ causou morte celular por necrose, porém, no meio contendo catalase as células apresentaram apoptose. Então, é possível correlacionar níveis de H₂O₂ e o tipo de morte ocorrida. Outros estudos relatam a ocorrência de apoptoses em parasita e outras linhagens celulares induzida por LAAOSV, *B. jararaca* (Deolindo *et al.*, 2010), *B. moojeni* (Stabéli *et al.*, 2007), *C. atrox* (Torii *et al.*, 2000) and *B. atrox* (Alves *et al.*, 2008).

Para melhor caracterizar as alterações fisiológicas e os mecanismos de morte celular desencadeada por LAAOBmar, foram observados seus efeitos sobre a fisiologia das formas epimastigota através da microscopia confocal utilizando iodeto de propídio (PI) e rodamina

123 (Rod123), como sondas fluorescentes para os ensaios da integridade da membrana e do potencial de membrana mitocondrial, respectivamente.

Nossas observações indicaram perfis diferentes de acordo com a concentração de LAAOBmar utilizada e o tipo de marcação. Nos grupos marcados com rodamina e tratados com menor concentração mostrou uma intensa atividade mitocondrial com células emitindo forte fluorescência. Apesar das alterações morfológicas visualizadas na MET, a atividade mitocondrial persiste. Por outro lado, na maior concentração foi possível identificar diminuição da intensidade da fluorescência emitida pela Rod 123, sugerindo um possível colapso no potencial da membrana mitocondrial. Na mesma concentração uma intensa marcação por IP foi observada, indicando uma diminuição ou perda da integridade da membrana. Veiga-Santos *et al.*, (2013) descreveu que os danos mitocondriais podem ser alvos iniciais no processo que culmina da morte do parasita, logo, nós sugerimos que o mecanismo envolvida na morte celular é dependente da intensidade da concentração de LAAOBmar com provável correlação da produção de H_2O_2 . Esses dados fisiológicos corroboram com as análises ultraestruturais.

De acordo com Deolindo e colaboradores (2010), o H_2O_2 pode levar a alterações na função da mitocondrial do parasita através da produção de espécies reativas de oxigênio. Nossos achados são similares aos estudos com outras LAAOSVs (Deolindo *et al.*, 2010; Sant'ana *et al.*, 2008).

As alterações morfológicas e fisiológicas aqui observados, como a perda da integridade da membrana e da ruptura do potencial de membrana mitocondrial do parasita, sugere fortemente que a LAAOBmar induz morte celular por necrose e são consistentes com os nossos resultados ultraestruturais.

Em levedura, bem como em células de mamífero, esta susceptibilidade proeminente das mitocôndrias, pode ser, em parte, explicado pelo fato de que o DNA mitocondrial é muito mais sensível a danos causados pelo estresse oxidativo que o DNA nuclear, devido à capacidade limitada destas anteriores em organelas reparar danos DNA. Se este princípio também é aplicável aos tripanossomatídeos, esta afirmação assume particular relevância, uma vez que estes parasitas são fortemente dependentes do seu único metabolismo mitocôndria (Fidalgo e Gilles, 2011).

Por fim, nossos achados indicam que a L-aminoácido oxidase do veneno da *Bothrops marajoensis* mostrou efeitos em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, dessa forma, a LAAOBmar demonstra potencial como modelo de moléculas tripanocida.

7 CONCLUSÕES

- A LAAOBmar mostrou significativo efeito citotóxico sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*, cepa Y, sendo esta última mais suscetível ao tratamento.
- A enzima LAAOBmar apresentou maior seletividade para o tripomastigota que às células mamíferas estudadas.
- A ação tripanocida observada no presente trabalho é parcialmente dependente da produção de peróxido de hidrogênio.
- Sugerimos que a LAAOBmar induz injúrias morfológicas e fisiológicas ao parasita levando a um colapso no potencial mitocondrial, ocasionando aumento da autofagia e morte celular por necrose.
- Portanto, a LAAOBmar se destaca como importante molécula bioativa contra os parasitas do *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ADADE, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of *Trypanosmatids*: Target for anti-parasitic drugs. **The open Parasitol J**, n. 4, p. 178-187, 2010.

ADADE, C.M., CONS, B.L., MELO, P.A., SOUTO-PADRÓN, T., Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol** n.138, p. 46-58, 2011.

ADADE, C. M.; CHAGAS, G. S.; SOUTO-PADRÓN, T. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol**, v.139, n.11, p.1444-1461, 2012.

ADADE, C. M. OLIVEIRA, I. R.; PAIS, J. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, n. 69, p. 227-239, 2013

ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 384, n. 2, p. 216-226, 2000.

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

ALVAREZ, V. E. KOSE, G.; SANT'ANNA, C.; TURK, V.; CAZZULO, J.J.;TURK, B. Autophagy is involved in nutritional stress response and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **The J of Biol Chem**, v. 283, p. 3454 3464, 2008

ALVES R. M. ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J.;GIGLIO, J.R.; ROSA, J. C.; FULY, A. L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 151, n. 4, p. 542-50, 2011.

ALVES PAIVA, R. M.; De FREITAS FIGUEIREDO, R.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; DE LOURDES, P. B. M.; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; LINHARIS, R. P. R. C.; GOMES, M. C. H.; DE ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 941-7, 2011.

AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 4, p. 367-393, 2002

ANDE, S. R. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n. 8, p. 1439-1451, 2006.

ANDRADE, S. G. RASSI, A.; MAGALHAES, J. B.; FERRIOLLI, F. F.; LUGUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 86, p. 624 – 626, 1999.

APT, W. AQUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTÉS, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas Disease with itraconazole and allopurinol. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, p. 133-138, 1998.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas Disease. **Drug Des Devel Ther**, v. 24, n. 4, p. 243-53, 2010.

BAIXAULI, F.; LÓPEZ-ÓTIN, C.; MITTELBRUNN. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. **Front. Immunol.** n. 5, p.403, 2014

BECERRA, M. C. GUIÑAZÚ, N.; HERGERT, L. Y.; PELLEFRINI, A.; MAZZIERI, M. R., GEA, S., ALBESA, I. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Exp Parasitol**, n. 131, p. 57–62, 2012.

BELLO C.; A.HERMOGENES, A. L.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M., SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189-200, 2005.

BENITEZ, D. PEZAROGLO, H.; MARTÍNEZ, V.; CASANOVA, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; GONZÁLEZ, M.; CARECETTO, H. Study of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis. **Parasitol**, v. 39, n. 4, p. 506-515, 2012

BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for chornic Chagas' Disease. **The New Engl J of Med**, n. 364, p. 2527-2534, 2011.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the Unites States. **Clin Infect Dis**, n. 49, p. 52-54, 2009.

BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) Snakes a natural history. **New York: Sterling Publishing Co.**, p. 194-209, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev Societ Bras de Med Trop**, n. 38, p. 1-29, 2005

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria Guia de Vigilância Epidemiológica | Caderno 10 Secretaria de Vigilância em Saúde /MS 2009a

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Casos de Doença de Chagas Aguda (DCA), Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabchagascasos0509.pdf>. 2009b Acessado em 10 de outubro de 1014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL.

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/l2-doenca-de-chagas/11114-informacoes-tecnicas-chagas>, 2014a. Acessado em 10 de outubro de 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Sistema de Vigilância Sanitária – Sistema de Agravos de Notificação – SINAN Net, 2014b . Acessado dia 28 de outubro de 2014.

BREGGE-SILVA, C.; NONATO, M. C.; de ALBUQUERQUE, S.; HO, P. L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L.; VASCONCELOS, D. M. R.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARANTES, E. C. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, n. 60, p.1263-1276, 2012.

BURMAN, C.; KTISTAKIS, N. T. Autophagosome formation in mammalian cells. **Semin Immunopathol**, v. 32, n.4, p. 397-413, 2010.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; de MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P., CARVALHO, B. M., da SILVA, S. L., STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int**. v. 2014, ID:196754, 2014.

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

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v. 94 (Suppl. 1), p. 331 – 336, 1999.

CAVALCANTI, L. P. G.; ROLIM, D. B.; PIRES NETO, R. J.; VILAR, D. C. L. F.; NOGUEIRA, J. O.; POMPEU, M. M. L.; TEIXEIRA, M. J. SOUSA, A. Q. Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. **Cad. Saúde Colet** Rio de Janeiro, v.17, n. 4, p. 911 - 921, 2009.

CESTARI, I. S. *Trypanosoma cruzi* e o Sistema Complemento: Mecanismos de ativação e o papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispaning) na resistência à lise de cepas de classe I e II. **Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do título de Mestre em Ciências**. Rio de Janeiro, 2006.

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

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas Disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop.**,v. 5, n. 1, p. 5-13, 2010.

COURA JR.; CASTRO, SL. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz** n. 97, p. 3-24, 2002.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COSTA TORRES, A .F.; DANTAS, R .T.; TOYAMA, M. H., Diz Filho, E., Zara, F. J., Queiroz, M.G.R., Nogueira, N., A.P., De OLIVEIRA, A. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. S. Z.; MARTINS, A. M. C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon** n.55, p. 795–804, 2010.

DAMASCENO, F. S.; BARISÓN, M. J.; PRAL, L. S.; SILBER, A. M. Memantine, an Antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, Affects Cell Proliferation, Differentiation and the Intracellular Cycle and Induces Apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis** v. 8, n. 2, e2717, 2014.

DEOLINDO, P. TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J.; ARNHOLDT, A. C.; COUZA, W. D., ALVES, E. W.. DAMATTA, R. A. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 33-38, 2005.

DEOLINDO, P. TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. L- Amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 944-955, 2010.

De SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 89-100, 2009

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002

DIAS, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas Disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, suppl.1, 2007

DIAS, J. C.; DIAS, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; VITELLI-AVELAR, D.; CORREIRA, D., LAGES, E.; PRATA, A. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas Disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 5, p. 505-506, 2008.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Rev da Soc Bras Med Trop**, v 44, n. 3, p. 375-379, 2011

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil, **Suplem II**, v. 44, 2011

DIAS, J. C. P.; MACHADO, E. M. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES. M. C. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16(Sup. 2), p.13-34, 2000.

DIAS, J. C.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas Disease **Rev Soc Bras Med Trop** v. 41, n. 1, p. 123-125, 2014.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.

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

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharm Res.** v. 28, n. 11, p. 2758-70, 2011.

FRANÇA, S. C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M.; TICLI, F. K.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STÁBELI, R. G.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: Cdna cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem and Bioph Res Comm**, n. 355, p. 302–306, 2007.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, n. 62, p. 75-82, 2013.

GADELHA, F.R.; GONÇALVES, C.C.; MATTOS, E.C.; ALVES, M.J.; PIÑEYRO, M. D., RONELLO, C.; PELOSO, E.F. Release of the cytosolic trypanedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigote **Exper. Parasitol**, n. 133, p. 287-293, 2013.

GALVÃO, C.R.; CARCAVALLO, D.; ROCHA, S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p.1-36, 2003.

GALLÉ, J. B.; ATTIOUA, B.; KAISER, M.; RUSING, A. M., LOBSTEIN, A.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C. Eleanolone, a Diterpene from the French Marine Alga *Bifurcaria bifurcata* Inhibits Growth of the Human Pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. **Mar. Drugs** , n. 11,p. 599-610, 2013.

GASCON, J., BERN, C., PIZANO, M-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries **Acta Tropica**, n. 115, p. 22–27, 2010.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; de SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitol Res**, v88, p598-602, 2002.

GUO, C. LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M. Z. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon** n. 60, p. 302-311, 2012.

HAILEY, D. W. RAMBOLD, A. S.; SATPUTE-KRISHNAN, P.; MILTRA, K.; SOUGRAT, R.; KIM, P. K.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656-667, 2010.

HARVEY, A. L. BRANDLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J. A.; QUILLIFELDT, J. A.; JERUSALINSKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635-1640, 1998.

HARVEY, A. L. From venoms to drugs: Introduction. **Toxicon**, 59, 2010, p 433.

HIGUCHI D. A. BARBOSA, C. M.; BINCOLETTA, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 319-328, 2007.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L. Biochemical and functional characterization of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bio and Med Chem**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

IZIDORO, SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; da SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F.; CALSERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry **BioMed Res Int**, v 2014, ID 196754, 2014.

IZUMI E. UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **J Med Chem**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

JIMENES, V.; PAREDES, R.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **J of Cell Biochem**, v.105, p. 688 698, 2008.

JIN, Y.; LEE, W. H.; ZENG, L.; ZHANG, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom. **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 479–489, 2007

KHAN, A. A.; RIEMERSMA, J. C.; BOOIJ, H. L. The reactions of osmium tetroxide with lipids and compounds. **J Histochem Cytochem**, n. 9, p. 560-563, 1961
KESSLER, R. L.; SOARES, M. J.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: Morphophysiological alterations leading to cell death. **Plos one**, v. 8, 2013.

KESSLER, R. L. SOARES, M. J.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: Morphophysiological alterations leading to cell death. **Plos one**, v. 8, 2013.

KIRCHHOFF, L. V. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): a tropical disease now emerging in the United States. **Emergi Infect**, v. 3, p. 111 – 134, 1999.

KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. **Anal Biochem**, v. 298, n. 1, p. 136-139, 2001

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEVASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

KOH, D. C. KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics—Cardiovascular examples. **Toxicon**, 59, p. 497-506, 2012.

LEE, M. L.; FUNG, S. Y.; CHUNG, I.; PAILOOR, J.; CHEAH, S. H.; TAN, N. H. Anti-Proliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom L-Amino Acid Oxidase. **Basic & clinic Pharm & Tox**, n. 4, 2014

LI, R. ZHU, S.; WU, J.; WANG, W.; LU, Q.; CLEMETSON, K. J. L-amino acid oxidase from *Naja atra* activates and binds to human platelets. **Acta Biochim Biophys**, v. 40, p. 9-26, 2008.

LOPES, A. H.; GOMES, M. T.; DUTRA, F. L.; VERMELHO, A. B.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SILVA-NETO, M. A. C.; SOUTO-PADRÓN, T.; VIEIRA, D. P. Intracellular signaling pathways involved in cell differentiation in *Trypanosomatids*. **The Open Parasitol J.**, n. 4, p. 102-110, 2010.

LUKASHEVA, E. V.; EFREMOVA, A. A.; TRESHALINA, E. M.; ARINBARASOVA, A. Y.; MEDENTZEV, A. G.; BEREZOV, T. T. L-amino acid oxidases: properties and molecular mechanisms of action. *Biochemistry (Mosc)* **Suppl Ser B: Biomed Chem** v. 5, n. 4, p. 337–345, 2011.

MACHEROUX, P. , SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFÜRST, M.; AU, L. C.; GHISLA, S. . “L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*: Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme,” **Europ J of Biochem**, v. 268, n. 6, p. 1679–1686, 2001

MAGALHÃES, A. MAGALHÃES, H. P.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*, **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 565-575, 2007.

MARTINS, A. V. GOMES, A. P.; MENDONÇA, E. G.; FIETTO, J. L. R.; SANTANA, L. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; GELLER, M.; SANTOS, R. R.; VITORINO, R. R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, 2012

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. Jr.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 11, p.817-24, 2012.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, JR.; AVEZUM, JR. A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A.; MORILLO, C. A.; SOSA-ESTANI, S.; YUSUF, S. The benefit Trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem Inst Osw Cruz** n. 104, p. 319-324, 2009.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Trop** n130, p.167-174, 2014.

MATSUO A. L, SILVA, L. S.; TORRECILHAS, A. C.; PASCOALINO, B. S.; RAMOS, T. C.; RODRIGUES, E. G.; SCHENKMAN, S.; CAIRES, A. C.; TRAVASSOS, L. R. In vitro and in vivo trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 8, p. 318-325, 2010.

MORTARI, M. R. CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol Ther**, v. 114, n. 1, p171-183, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

ORTÍ-LUCAS, R. M.; PARADA-BARBA, M. C.; DE LA RUBIA-ORTÍ, J. E.; CARRILLO-RUIZ, A.; BESO-DELGADO, M.; BOONE, A. L. Impact of Chagas Disease in Bolivian immigrants living in Europe and the risk of stigmatization. **J of Parasitol Res**, 2014.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JR., A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Atualização**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas Disease: a review. **J of Ven Ani and Tox incl Trop Dis**, v. 19, 2013.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proc Natl Acad Sci** v. 98, p. 7301-7306. 2001

POLLEGIONE, L.; MOTTA, P.; MOLLA, G. L-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 97, p. 9323-9341, 2013.

PELOSO, E. F.; VITOR, S. C.; RIBEIRO, L. H.; PIÑEYRO, M. D.; ROBELLO, C.; GADELHA, F. R. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **J. Bioenerg Biomemb** n. 43, p.419-424, 2011.

POLLITT, L. C.; COLEGRAVE, N.; KHAN, S. M.; SAJID, M.; REECE, S. E. Investigating the evolution of apoptosis in malaria parasites: the importance of ecology. **Parasitol Vect**, v. 3, 2010

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 3-4, p. 328-3, 2006

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, A. Chagas Disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-13402, 2010

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infect Dis Clin N Am**, v. 26, p. 275–291, 2012

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** n. 91, p. 490–501. 2009

SANCHEZ, E. F. GABRIEL, L. M.; GONTIJO, S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; EVANGELISTA K. S.; EBLE, J. A.; RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 15, n. 2, p. 193-204, 2007.

SANCHEZ, E. F.; SWENSON, S. **Curr. Pharm. Anal**, v. 3, p. 147–157. 2007.

SANCHEZ, E. F.; EBLE, J. A. P-III metalloproteinase (leucurolysin-B) from *Bothrops leucurus* venom: isolation and possible inhibition. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitor*, n. 33, p. 789-812, 2009.

SANT'ANA, C. D.; MENALDO, D. L.; COSTA, T. R.; GODOY, H.; MULLER, V. D.; AQUINO, V. H.; ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V.; MONTEIRO, M. C.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence. **Biochem Pharmacol**, n. 76, p. 279–288, 2008.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 115, n 1-2, p. 14-21, 2010.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 3, p. 374-389, 2002.

SILVA, D. T. DE NAZARETH, S. L.; DE MEIRELLES, M.; ALMEIDA, D.; URBINA, J. A.; PEREIRA, M. C. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, p. 530-537, 2006.

STÁBELI, R. S.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, JR.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg e Medic Chem**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÁBELI R. G. SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **Biol Macrom**, v. 41, p. 132-140, 2007.

SUHR, M.; KIM, D. S. Comparison of the Apoptotic Pathways induced by L-amino acid oxidase and Hydrogen Peroxide. **J of Biochem** 125, 305-309. 1999.

- TAKATSURA, H. SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUBO, T.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MATSUI, T.; TITANI, K.; YAGI, H.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y. . Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1544, p. 267-277, 2001
- TEMPONE, A. G. ANDRADE, H. F. JR.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania spp.* with hydrogen generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, p. 620-624, 2001.
- TIMM, B. L.; DaSILVA, P. B.; BATISTA, M. M.; FARAHAT, A. A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. In vitro investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*, **Parasitol** n.141,p. 1272–1276, 2014.
- TORII, S. YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochem**, v. 39. n. 12, p. 3197-3205.
- TORRES A. F. DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. .; H, DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 795-804, 2010.
- TOOZE, S.A. Current views on the source of the autophagosome membrane. *Essays Biochem.* v. 55, p. 29-38, 2013
- UBRINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Suppl 1, p. 311-318, 2009.
- URBIDA. J. A., Do CAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **TRENDS in Parasitol** v.19, n.11, 2003.
- VEIGA-SANTOS, P. DESOTI, V. C.; MIRANDA, N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; CORTEZ, D. A.; DE MELLO, J. C; NAKAMURA, C. V.. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, n. 125, p. 349-356, 2013.
- VENDRAMETTO, M. C. ; DOS SANTOS, A. O. ; NAKAMURA, C. V. ; DIAS FILHO, B. P. ; CORTEZ, D. A. G. ; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellivar.pallesens*. *Parasitol Intern* n 59, p 154-158, 2010.
- VIOTTI, R. VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas Disease: fears and realities. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, p. 157–163, 2009.

VILCHEZ, L.S. C.; ALONSO, G. D.; SCHLESINGER, M.; TORRES, H. N.; FLAWIÁ, M. M.; FERNÁNDEZ VILLAMIL, S. H. Poly (ADP-ribose) polymerase plays a differential role in DNA damage-response and cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Internat J of Parasitol**, n. 41, p. 405-416, 2011.

ZEUTHEN, T.; WU, B.; PAVLOVIC-DJURANOVIC, S.; HOLM, L. M.; UZCATEGUI, N. L.; DUSZENKO, M.; KUN, J. F.; SCHULTZ, J. E.; BEITZ, E. Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. **Mol Microbiol**, v. 61, n.6, p.1598-608, 2006.

ZHANG, H. Purification partial characterization, crystallization and structural determination of AHP LAAO, a novel L-amino acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta crystallogr**, v. 60, p. 974-977, 2004.

WILLKINSON, S. R.; BOT, C.; KELLY, J. M.; HALL, B. S. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 16, p. 2072-2084, 2011.

WEI, J. F.; YANG, H. W.; WEI, X. L.; QIAO, L. Y.; WANG, W. Y.; HE, S. H. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 262–271. 2009.

World Health Organization. WHO Fact Sheet No 340. 2014.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessado em 20 de outubro de 2014).

YU, Z.; WANG, Y.; ZHOU, W. N.; ZHAO, M.; QIU, J.; LI, J. Advances in Detection Methods of L-Amino Acid Oxidase Activity Appl Biochem Biotechnol, n. 174, p.13–27, 2014.