



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

MARILIA LOPES MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTIDEOS TRIPANOCIDAS OTIMIZADOS A
PARTIR DA DINOPONERATOXINA M-PONTX-Dq3a.**

FORTALEZA – CE
OUTUBRO/ 2022

MARILIA LOPES MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTIDEOS TRIPANOCIDAS OTIMIZADOS A
PARTIR DA DINOPONERATOXINA M-PONTX-Dq3a.**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração Saúde.

Orientador (a): Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA – CE

OUTUBRO/ 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M778d Monteiro, Marília Lopes.
Desenvolvimento de peptídeos tripanocidas otimizados a partir da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a.
/ Marília Lopes Monteiro. – 2022.
108 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.

1. Trypanosoma cruzi. 2. doença de Chagas. 3. peptídeos antimicrobianos. 4. lisina. I. Título.

CDD 615

MARILIA LOPES MONTEIRO

DESENVOLVIMENTO DE PEPTIDEOS TRIPANOCIDAS OTIMIZADOS A PARTIR DA DINOPONERATOXINA M-PONTX-Dq3a.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração Saúde.
Orientador (a): Alice Maria Costa Martins

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr Ramon Roseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Marcia Marinho Machado
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Vani Xavier Oliveira Junior
Universidade Federal do ABC – (UFABC)

Dra. Danya Bandeira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha prima Maria Fernanda, e ao meu filho.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, nossa senhora e à sagrada família por todos os ensinamentos e dádivas em minha vida.

Em especial a Prof Dra Alice Maria Costa Martins por toda a confiança, carinho, atenção, acolhimento e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Vani Xavier Oliveira Junior e seu grupo de pesquisa pela síntese e design racional dos peptídeos

Ao Prof. Dr. Emmanuel Silva Machado e Profa Marcia Marinho Machado pelo auxílio nos ensaios de docking molecular.

À Dra. Mar Orzaéz, do Centro de Investigación Príncipe Felipe, pela síntese dos peptídeos .

À Central Analítica da UFC, pela realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

À CAPES, pelo suporte financeiro fornecido para a realização desse trabalho.

À banca qualificadora formada por profissionais maravilhosos, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes e Tiago Sampaio os quais admiro muito e só tenho a agradecer por toda nossa caminhada juntos, além das suas sugestões para engrandecer o presente trabalho.

À banca de defesa do doutorado composta por professores maravilhosos com extensa experiência na temática, que proporcionam a melhoria do presente trabalho.

À Danya Bandeira Lima, por toda a dedicação e ajuda durante a elaboração desta tese e de toda minha jornada.

À Brenna Pinheiro Silva por todas as ajudas nos experimentos, pelo colo na hora do choro e toda a amizade.

Ao meu filho por ter me escolhido como mãe, apesar do curto período em meu ventre, apenas 9 semanas, tive o consolo de ter ele comigo na reta final e na defesa do doutorado. Obrigada filho por estar presente no encerramento desse ciclo tão importante, espero um dia ser agraciada em poder te conhecer e ver o seu rosto.

À minha prima e anja da guarda Maria Fernanda, que desde muito pequena gostava da pesquisa e ciência, menina que aos 8 anos já sabia que queria ser bióloga e queria fazer mestrado e doutorado para ajudar no avanço da ciência, prima que desde que eu era aluna de iniciação científica já levava ao laboratório para olhar no microscópio. Infelizmente essa mesma curiosidade fez com que ela fosse morar com Deus aos 13 anos, mas foi por ela que tive garra e força para dar continuidade a elaboração e escrita dessa tese, por isso essa tese é diretamente para o céu, para a Maria. Obrigada prima por desde pequena, mesmo que não fosse sua intenção, me incentivar na pesquisa, você sempre me olhava como se eu fosse a pessoa mais inteligente do mundo por te explicar um pouco sobre o cultivo celular, por segurar e tratar o ratinho, enfim por fazer o mestrado e o doutorado.

Ao meu esposo Lucas Soares Chagas, por todo o incentivo, apoio e paciência durante aos meus 6 anos na pesquisa científica. Aos meus filhos pets Pitoco, Groot e Bruce por me acompanharem durante todo o processo da escrita.

À minha mãe por sempre acreditar em mim e sempre buscar o meu melhor mesmo quando eu queria desistir ela nunca deixou, sempre me disse que no final tudo iria dar certo.

À toda minha família, por todo apoio e incentivo ao longo da minha jornada científica.

Ao Laboratório de Bios prospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica e todos os seus integrantes por terem me recepcionado tão bem quando eu precisei, por toda ajuda e ensinamentos que me ofereceram, por todos os laços de amizade criados.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -FFOE por toda a ajuda e suporte oferecido

Às minhas amigas que me acompanham desde a época do colégio Leticia Sampaio, Isa Barros, Laís Frota e Thaís Frota, que sempre ajudam em todos os momentos da vida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá.

Resumo

A doença de Chagas afeta milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, o benznidazol disponível possui eficácia limitada e efeitos adversos severos, diante disso existe a necessidade de buscar substâncias com potencial terapêutico. O peptídeo antimicrobiano M-PONTX-Dq3a, isolado do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, mostrou melhor atividade tripanocida (*in vitro*) que as terapias atuais, porém o comprimento do peptídeo pode limitar suas possibilidades de alcançar aplicação clínica. Neste trabalho foi investigado o efeito antichagásico de dois fragmentos e oito análogos de M-PONTX-Dq3a com o intuito de melhorar a atividade antichagásica, e reduzir os custos de produção. Os fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a tiveram sua toxicidade avaliada nas células hospedeiras LLC-MK2, sendo observada maior C_{50} para o fragmento M-PONTX-Dq3a[3-15] (188,86 μM) e para os análogos substituídos por lisina com a EC_{50} variando entre (60 μM e 97 μM), o efeito sob as formas tripomastigotas, foi observado menores valores de EC_{50} para o fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] (0,59 μM) e para os análogos substituídos por lisina variando entre (0,86 μM e 1,09 μM), o índice de seletividade (IS) foi determinado, e foram selecionados os peptídeos mais promissores, o fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] (IS=72,9) e o análogo [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[3-15] (IS=85,3). Posteriormente foram analisados o efeito em formas epimastigotas, M-PONTX-Dq3a [1-15] demonstrou a menor EC_{50} em 24 horas (7,2 μM) e não demonstrou uma alteração significativa entre os tempos de 48 e 72 horas, [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] demonstrou diferenças significativas entre as EC_{50} dos 3 tempos, sendo a EC_{50} de 24 horas a menor encontrada (13,5 μM), sob as formas amastigotas foi observado efeito promissor com os dois peptídeos testados nos tempos de 24h e 48h, foi obtido para M-PONTX-Dq3a [1-15] EC_{50} 24h 1,32 μM e IS_{24h} 32,61; EC_{50} 48h 0,37 μM e IS_{48h} 96,7 e para [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] foi obtido EC_{50} 24h 0,91 μM e IS_{24h} 80,65; EC_{50} 48h 0,28 μM e IS_{48h} 156,6). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M e considerado $p < 0,05$. Na busca sobre o mecanismo de ação dos peptídeos selecionados, foram observadas alterações por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e marcações na citometria de fluxo sugerindo a necrose como principal mecanismo de ação, também foi observado o aumento em torno de 50% de espécies reativas de oxigênio em ambos os peptídeos testados e dano mitocondrial em cerca de 50% com o tratamento do [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15]. O docking molecular foi realizado com as enzimas cruzaina, tripanotona redutase e TcGAPDH, demonstrando que M-PONTX-Dq3a[1-15] se acoplou em diferentes sítios catalíticos de cada uma das enzimas testadas, enquanto [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[3-15] se acoplou a tríade catalítica da cruzaina. Em conclusão, os estudos levaram à identificação de dois peptídeos menores, o fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e o fragmento análogo [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[3-15] com atividade antichagásica semelhante e superior respectivamente, quando comparado ao índice de seletividade do peptídeo parental.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; peptídeo antimicrobiano; lisina; veneno de artrópodes.

Abstract

Chagas disease affects millions of people around the world. In Brazil, the available drug has limited efficacy and severe adverse effects, so there is a need to seek substances with therapeutic potential. The antimicrobial peptide M-PONTX-Dq3a, isolated from the venom of the ant *Dinoponera quadriceps*, showed better trypanocidal activity (in vitro) than current therapies, but the length of the peptide may limit its possibilities of achieving clinical application. In this work, the antichagasic effect of two fragments and eight analogues of M-PONTX-Dq3a was investigated in order to improve the antichagasic activity and reduce production costs. The M-PONTX-Dq3a fragments and analogues had their toxicity evaluated in LLC-MK2 host cells, with a higher EC₅₀ being observed for the M-PONTX-Dq3a[3-15] fragment (188.86 μ M) and for the analogues substituted by lysine with EC₅₀ varying between (60 μ M and 97 μ M), the effect on the trypomastigote forms, lower EC₅₀ values were observed for the M-PONTX-Dq3a[1-15] fragment (0.59 μ M) and for the analogs substituted by lysine varying between (0.86 μ M and 1.09 μ M), the selectivity index (SI) was determined, and by means of the WHO criteria, the most promising peptides were selected, the fragment M-PONTX-Dq3a[1-15] (IS=72.9) and the analog [Lys]3-M-PONTX-Dq3a[3-15] (IS=85.3). Subsequently, the effect on epimastigote forms was analyzed, M-PONTX-Dq3a [1-15] showed the lowest EC₅₀ at 24 hours (7.2 μ M) and did not show a significant change between the times of 48 and 72 hours, [Lys] 3M-PONTX-Dq3a[1-15] showed significant differences between the EC₅₀ of the 3 times, with the 24-hour EC₅₀ being the lowest found (13.5 μ M) and under the amastigote forms a promising effect was observed with the two peptides tested in the times of 24h and 48h, it was obtained for M-PONTX-Dq3a [1-15] EC₅₀ 24h 1.32 μ M and IS/24h 32.61; EC₅₀ 48h 0.37 μ M and IS/48h 96.7 and for [Lys]3M-PONTX-Dq3a[1-15] it was obtained EC₅₀ 24h 0.91 μ M and IS/24h 80.65; EC₅₀ 48h 0.28 μ M and IS/48h 156.6). Results were expressed as mean \pm SEM and considered $p < 0.05$. In the search for the mechanism of action of the selected peptides, alterations were observed by scanning electron microscopy (SEM) and flow cytometry markings suggesting necrosis as the main mechanism of action, an increase of around 50% of reactive species was also observed. of oxygen in both peptides tested and mitochondrial damage by about 50% with the treatment of [Lys]3M-PONTX-Dq3a[1-15]. Molecular docking was performed with the enzymes cruzain, trypanothione reductase and TcGAPDH, demonstrating that M-PONTX-Dq3a[1-15] was coupled at different catalytic sites of each of the enzymes tested, while [Lys]3-M-PONTX- Dq3a[3-15] is coupled to the catalytic triad of cruzin. In conclusion, the studies led to the identification of two smaller peptides, the M-PONTX-Dq3a[1-

15] fragment and the analog fragment [Lys]3-M-PONTX-Dq3a[3-15] with similar and superior antichagasic activity. respectively, when compared to the parental peptide selectivity index.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; antimicrobial peptide; lysine; arthropod venom..

Lista de Figuras

Figura 1.	Distribuição de doença de Chagas no mundo.	18
Figura 2.	Principais manifestações clínicas da fase aguda da DC.	19
Figura 3.	Curso clínico da doença de Chagas	20
Figura 4.	Estrutura química do Benznidazol	21
Figura 5.	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	22
Figura 6.	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .	23
Figura 7.	Cruzaína.	25
Figura 8.	GAPDH	25
Figura 9.	Tripanotiona redutase	26
Figura 10.	Principais mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos	30
Figura 11.	<i>Dinoponera quadriceps</i> .	31
Figura 12.	Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	45
Figura 13.	Representação esquemática do ensaio para determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre células hospedeiras LLC-MK2	46
Figura 14	Representação esquemática do ensaio para avaliação do efeito dos peptídeos testados sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .	47
Figura 15.	Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	48
Figura 16.	Desenho experimental e projeções da roda helicoidal de dinoponeratoxinas, fragmentos e seus análogos.	54
Figura 17.	Efeito de M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma amastigota intracelular de cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	60
Figura 18.	Avaliação por citometria de fluxo da morte celular de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	62
Figura 19.	Análise de citometria de fluxo da formação de EROS em formas epimastigotas tratadas com M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15].	63
Figura 20.	Análise de citometria de fluxo no potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas tratadas com Dq3a [1-15] e [Lys] ³ -Dq3a[1-15].	64
Figura 21.	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 12 h de incubação com Dq3a[1-15] e [Lys] ³ -Dq3a[1-15].	65
Figura 22.	Complexos de cruzaína com [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] (A), [Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15] (B), [Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] (C), [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15](D).	66

Figura 23.	Complexo de interação entre a enzima cruzaina e os ligantes [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] e KB2 (A). Sítio de interação do ligante [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] com o alvo (B).	67
Figura 24.	Tripanotona redutase complexada com [Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] (A) e [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] (B).	68
Figura 25.	Complexos TcGAPDH cristalizados com [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15].	69
Figura 26.	Efeito citotóxico de [Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.	84
Figura 27.	Efeito citotóxico de [Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.	84
Figura 28.	Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.	85
Figura 29.	Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[3-15] sobre LLC-MK2.	85
Figura 30.	Efeito citotóxico de [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.	86
Figura 31.	Efeito citotóxico de [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.	86
Figura 32.	Efeito citotóxico de [Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.	87
Figura 33.	Efeito citotóxico de [Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	87
Figura 34.	Efeito citotóxico de [Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	88
Figura 35.	Efeito citotóxico de [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	88
Figura 36.	Efeito citotóxico de [Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	89
Figura 37.	Efeito citotóxico [Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	89
Figura 38.	Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	90
Figura 39.	Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	91
Figura 40.	Efeito citotóxico sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	92
Figura 41.	Efeito citotóxico M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	92
Figura 42.	Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma epimastigota da cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	92
Figura 43.	Efeito citotóxico de [Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	93

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Dinoponeratoxinas	32
Tabela 2.	Fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a.	43
Tabela 3.	Propriedades físico-químicas de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a.	53
Tabela 4.	Efeito citotóxico dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a sobre as células LLC-MK2.	55
Tabela 5.	Efeito antichagásico de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em formas tripomastigotas da cepa Y <i>T. cruzi</i> e índice de seletividade.	56
Tabela 6.	Efeito de Dq3a [1-15] e [Lys] ³ -Dq3a[1-15] contra a forma epimastigota de cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	57
Tabela 7.	Efeito de M-PONTX-Dq3a e [Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15] contra formas amastigotas de cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e índice de seletividade.	59
Tabela 8.	Modelos resultantes do docking entre os peptídeos e a enzima cruzaina.	65
Tabela 9.	Modelos resultantes do docking entre os peptídeos e a enzima Tripanotiona redutase.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-Amino Actinomicina D Anexina-V Anexina V- ficoeritrina
BZ	Benznidazol
CT	Controle
DC	Doença de Chagas
DCF	2',7'- diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
Dntxs	Dinoponeratoxinas
EPM	Erro Padrão Médio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EC₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
PI	Iodeto de propídeo
IS	Índice de seletividade
LIT	Meio Liver infusion tryptose
LDH	Lactato Desidrogenase
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PBS	Tampão fosfato em salina
Rho	Rodamina 123

Rpm	Rotação por minuto
TcCR	Cruzaína
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
μH	Momento hidrofóbico
$\Delta\Psi_m$	Potencial transmembrânico mitocondrial

Sumário

1.	Introdução	17
1.1	Doença de Chagas	17
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.2.1	Principais enzimas do <i>T. Cruzi</i>	
1.3	Peptídeos antimicrobianos como modelo para o desenvolvimento de medicamentos	27
1.4	Dinoponeratoxinas	31
2.	Justificativa	37
3.	Objetivos	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4.	Metodologia	42
4.1	Substâncias em Estudo	42
4.2	Síntese e Purificação dos peptídeos	42
4.3	Ensaio <i>in vitro</i>	44
4.3.1	Cultivos de parasitos e de células de mamíferos	44
4.3.2	Avaliação do efeito dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a sobre as formas tripomastigota de <i>T. Cruzi</i> .	44
4.3.3	Avaliação da toxicidade dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em células de mamíferos LLCMK2.	45
4.3.4	Avaliação do efeito do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre as formas amastigotas intracelulares.	46
4.3.5	Avaliação do efeito fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	47
4.3.6	Determinação da integridade da membrana do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] por citometria de fluxo.	48
4.3.7	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] por citometria de fluxo.	44
4.3.8	Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] por citometria de fluxo	49
4.3.9	Análises ultraestruturais do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	49
4.3.10	Verificação da possível interação entre o fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys] ³ -M-PONTX-Dq3a[1-15] com as enzimas de tripanossomatídeos por docking molecular.	50

4.3.10.1	Predição da estrutura 3D dos peptídeos	50
4.3.10.2	Docking Molecular	51
4.4	Análise Estatística	51
5	Resultados	53
5.1	Propriedades físico-químicas de fragmentos e análogos do peptídeo de M-PONTX-Dq3a.	53
5.2	Avaliação da citotoxicidade dos fragmentos e análogos derivados M-PONTX-Dq3a em células LLC-MK2.	57
5.3	Efeito antichagásico de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em formas tripomastigotas de <i>T. Cruzi</i> .	58
5.4	Efeito antichagásico de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	59
5.5	Efeito antichagásico de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a na forma amastigota de <i>T. Cruzi</i> .	60
5.6	Avaliação do perfil de Morte.	61
5.7	Mensuração da liberação de espécies reativas de oxigênio.	62
5.8	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).	64
5.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	65
5.10	Docking Molecular.	65
6.	Discussão.	72
7.	Conclusão	79
8.	Referências bibliográficas	81
9.	Apêndices	85
9.1	Apêndice A	75
9.2	Apêndice B	87

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo cinetoplastídeo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que possui como principais vetores os insetos triatomíneos. Também chamada de tripanossomíase americana, a doença foi descrita pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909, mas a sua existência é datada há mais de 9 mil anos (GUARNER, 2019; NGUYEN & WASEN, 2021).

O *Trypanosoma cruzi* foi identificado há mais de 100 anos como o agente causador da DC, porém a doença segue sendo um problema social e de saúde pública, principalmente, na América (PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a DC umas das principais doenças tropicais negligenciadas do mundo (WHO, 2018), que se caracteriza como endêmica em 21 países da América Latina, afetando cerca de 6 a 8 milhões de pessoas e levando a morte de 14.000 pessoas por ano. (VENTURA-GARCIA et al. 2013; WHO, 2018; SANTOS *et al.* 2020).

Estudos recentes, mostraram que a distribuição da doença sofreu alterações devido a migração de indivíduos dos países endêmicos para aqueles que, ainda, não possuíam casos da doença (NGUYEN & WASEN, 2021). São descritos na literatura, casos na Europa, América do Norte, Japão, Austrália, dentre outros, o que denota a presença da doença em diferentes países e continentes, calculando-se que mais de 75 milhões de pessoas possam estar em risco de contrair a doença. Dessa forma, esse processo migratório e modos específicos de transmissão trouxeram a doença para fora dos seus limites geográficos naturais, como mostra a figura 1, e a tornaram uma preocupação global (MORILLA & ROMERO, 2015; CHATELAIN *et al.*, 2017; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2017; NORMAN & VÉLEZ, 2019).

Na América do Sul, a Bolívia aparece como o país com a maior prevalência (6,8 a 18%) de casos de DC. Outros países como Argentina (4,1%) e Brasil (1,0%) apresentam mais da metade da população infectada da América Latina, apesar de registrarem menor prevalência (ECHEVERRIA & MORILLO, 2019).

Figura 1. Distribuição de Doença de Chagas no Mundo.



Fonte: adaptado de DNDI (2018).

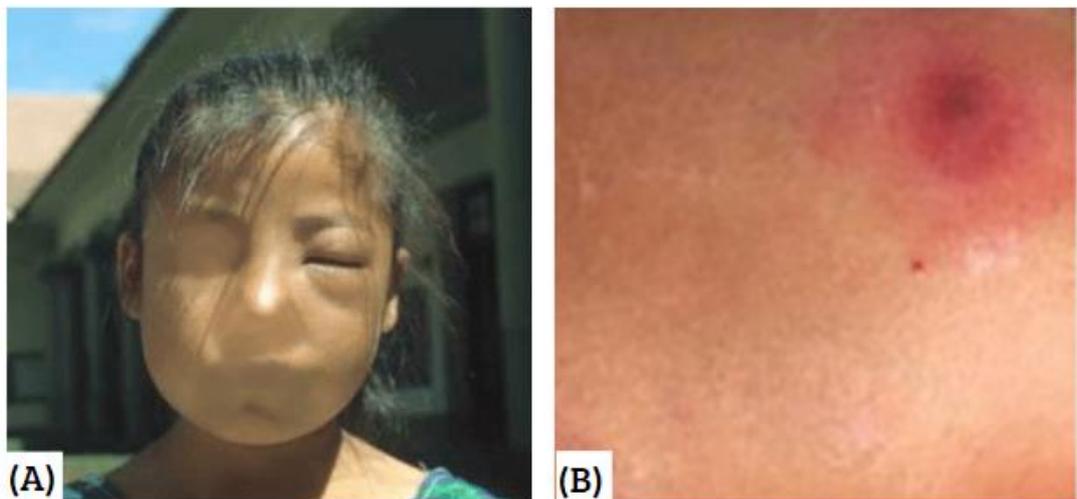
A DC, no Brasil, foi considerada, dentre todas as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), a principal causa de *disability-adjusted life years* (DALYs), ou seja, anos de vida ajustados por incapacidade, que é dada pela soma dos anos de vida perdidos, devido à mortalidade prematura, e dos anos vividos com incapacidade para uma determinada doença ou lesão (MARTINS-MELO *et al.* 2018). Alguns estudos realizados de maneira retrospectiva, evidenciaram que a DC apresenta 50% de casos agudos nas microrregiões brasileiras, bem como a evolução da fase aguda para a fase crônica se deu principalmente nas macrorregiões do país, com destaque para as regiões Norte e Nordeste (SANTOS *et al.* 2020).

A transmissão da DC, em áreas endêmicas, se dá principalmente por vetores triatomíneos, porém, em regiões não endêmicas, a infecção pode ser transmitida por outros meios, tais como ingestão oral do inseto, acidentes de laboratório, transplante de órgãos, agulhas compartilhadas e pela transmissão vertical (de mãe para filho) (NGUYEN & WASEM, 2021; ECHEVERRIA & MORILLO, 2019).

São três vetores principais que podem transmitir *T. cruzi*: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*. No Brasil, esses insetos são denominados de “barbeiros” e têm preferência por realizar a sua alimentação, mais frequentemente, em locais com baixa umidade, temperatura acima de 30 graus e no período noturno. Esse inseto possui o hábito de defecar imediatamente após a alimentação e, assim, libera o parasito (SHORT, CAMINADE & THOMAS, 2017; GUARNER, 2019).

A DC se apresenta em 3 fases clínicas: aguda, indeterminada e crônica, onde a fase aguda ocorre nas primeiras 4 a 6 semanas após a infecção, podendo ser sintomática ou assintomática, o que dificulta o diagnóstico e tratamento eficiente para a doença. Essa fase é caracterizada pela alta parasitemia e os pacientes sintomáticos apresentam sinais no local da infecção, tais como chagoma de inoculação e sinal de Romanã, febre, mialgia e mal-estar (Figura 2). Em casos mais raros, podem ocorrer sintomas sistêmicos como adenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite. A fase aguda raramente é fatal, resultando em 2 a 8% de mortalidade. Em casos de transmissão vertical, o recém-nascido (RN) pode apresentar baixo peso, prematuridade e insuficiência respiratória (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2010; CARLIER *et al.* 2011; ECHEVERRIA & MORILLO, 2019; BOCCHI *et al.* 2017).

Figura 2. Principais manifestações clínicas da fase aguda da DC.



Legenda: (A) Paciente manifestando sinal de Romanã; (B) Chagoma de inoculação

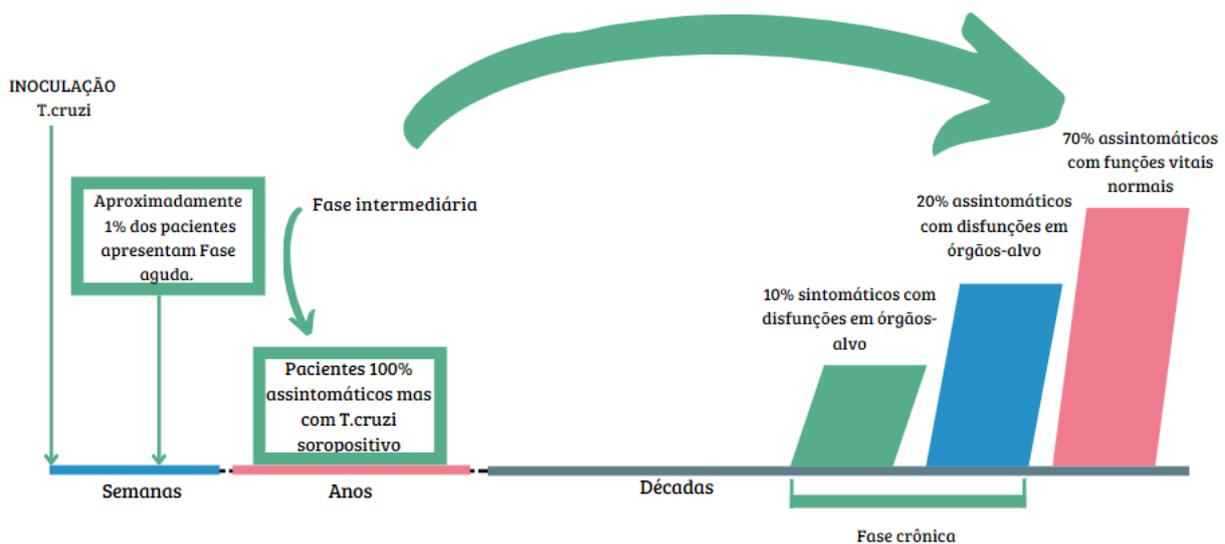
Fonte: adaptado de BELCLER, TORRICO & HIBBERT, 2020; GAMBOA *et al.* 2019.

Os pacientes com DC podem permanecer 10 anos ou mais na fase indeterminada que é caracterizada pela ausência de sintomas clínicos. Além disso, não ocorrem alterações nos resultados de eletrocardiograma e raio-x de coração (KASHIWABARA *et al.*, 2013; RASSI & CHATELAIN, 2017; DNDI, 2016).

Cerca de 30% dos pacientes infectados pela doença entram na fase crônica e apresentam danos aos órgãos-alvo, ou seja, ao atingir estágios avançados, estima-se que até 40% dos pacientes são conduzidos à morte por disritmias, insuficiência cardíaca congestiva, megaesôfago e megacólon. Além disso, estudos mostram que pacientes acometidos por cepas

do parasito, que circulam nas regiões de países como Argentina e Brasil, podem apresentar alterações intestinais exclusivas, chegando até a manifestarem distúrbios de absorção, motilidade e secreção, somadas as condições anteriormente citadas (RASSI, RASSI & MARINETO, 2010; ECHEVERRIA & MORILLO, 2019). A figura 3 explica o curso clínico da DC, relacionando tempo de infecção e manifestação das fases.

Figura 3: Curso clínico da doença de Chagas



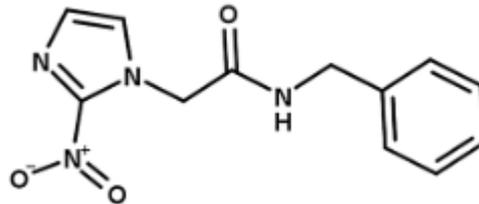
Fonte: adaptado de GUARNER, 2019

Estudos mostraram que a fase crônica da doença é responsável por uma alta porcentagem de incapacidade, o que acarreta um grande impacto social e econômico. No mundo, o impacto econômico gerado pela DC crônica supera o gasto de U\$ 7 bilhões por ano e no Brasil o de U\$ 1 bilhão (DNDi, 2016). Embora, as questões de saúde relacionadas com doença de Chagas, como a redução da produtividade e alta taxa de morbidade, causem um grande impacto econômico, ainda não existem tratamentos eficazes para essa condição (CHATELAIN, 2017).

O tratamento da DC, segundo a OMS, é realizado com o intuito de eliminar o parasito dos indivíduos infectados, reduzindo, então, a chance de desenvolvimento da doença sintomática e, conseqüentemente, dificultando a transmissão do parasito (WHO, 2012). No mundo, atualmente, apenas dois fármacos são utilizados no tratamento da doença: o benznidazol e o nifurtimox, porém, esses tratamentos são prolongados e costumam ser eficazes, principalmente, na fase aguda (KRATZ, 2019).

No cenário brasileiro atual, o único medicamento disponível para uso em humanos é o benznidazol (Figura 4), que apresenta eficácia limitada, sendo capaz de diminuir 80% a parasitemia, na fase aguda e 20% na fase crônica (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SESTI-COSTA et al., 2014).

Figura 4: Estrutura química do Benznidazol



Fonte: adaptado de KRATZ, 2019.

Os pacientes portadores da doença, mesmo utilizando o medicamento preconizado, não alcançam a cura parasitológica significativa, exceto para tratamento inicial na fase aguda (KRATZ, 2019). Ademais, o benznidazol é contraindicado para pacientes com insuficiência renal, insuficiência hepática, e apresenta efeitos genotóxicos (LOSADA, 2021; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012). Esse medicamento possui menor atividade contra cepas resistentes de *T. cruzi*, além de ser responsável pela alta frequência de reações adversas a medicamentos. As reações são variadas e afetam diversos locais dos organismos, onde o paciente pode apresentar agranulocitose, púrpura trombocitopênica, depressão da medula óssea, polineuropatias, parestesias e polineurites de nervos periféricos. Dessa forma, estima-se que cerca de 15 a 20% dos pacientes em tratamento acabam interrompendo o uso desse fármaco, o que dificulta, ainda mais, a terapia da DC (ALDASORO, 2018; KRATZ, 2018; LOSADA, 2021).

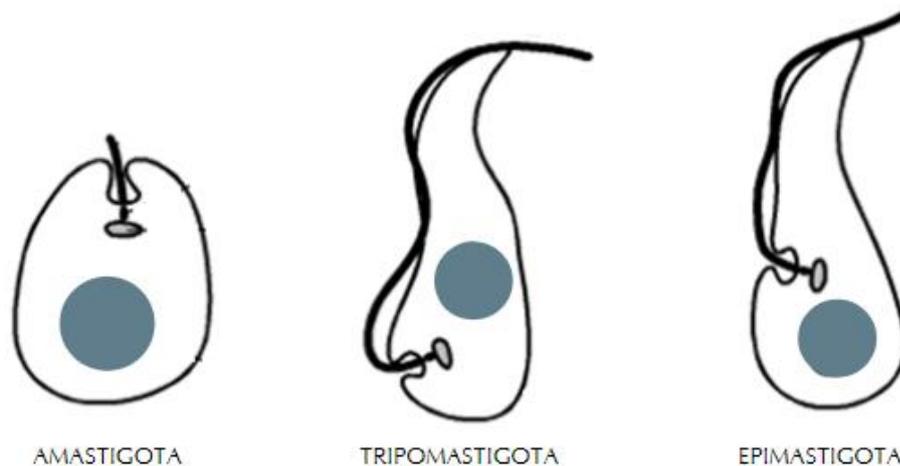
1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário unicelular e parasito obrigatório classificado dentro da Ordem Kinetoplastida, da classe Zoomastigophorea, que se desenvolve em insetos hematófagos da família Reduviidae, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos (GUARNER, 2019; CHAGAS, 1909).

O *T. cruzi* é caracterizado por apresentar um ciclo de vida complexo, classificado como heteroxênico, ou seja, requer passagem obrigatória em dois hospedeiros (o inseto vetor triatomíneo e um hospedeiro vertebrado). O ciclo inclui quatro fases de desenvolvimento do

parasito, duas delas são chamadas replicativas e ocorrem no inseto vetor (epimastigota) e no hospedeiro mamífero (amastigota) e duas são formas não replicativas, que incluem o tripomastigota metacíclico no inseto vetor e tripomastigota derivado de células no hospedeiro mamífero. A figura 5 mostra as principais formas evolutivas de *T. Cruzi* (LANDER, CHIURILLO & DOCAMPO, 2021).

Figura 5: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



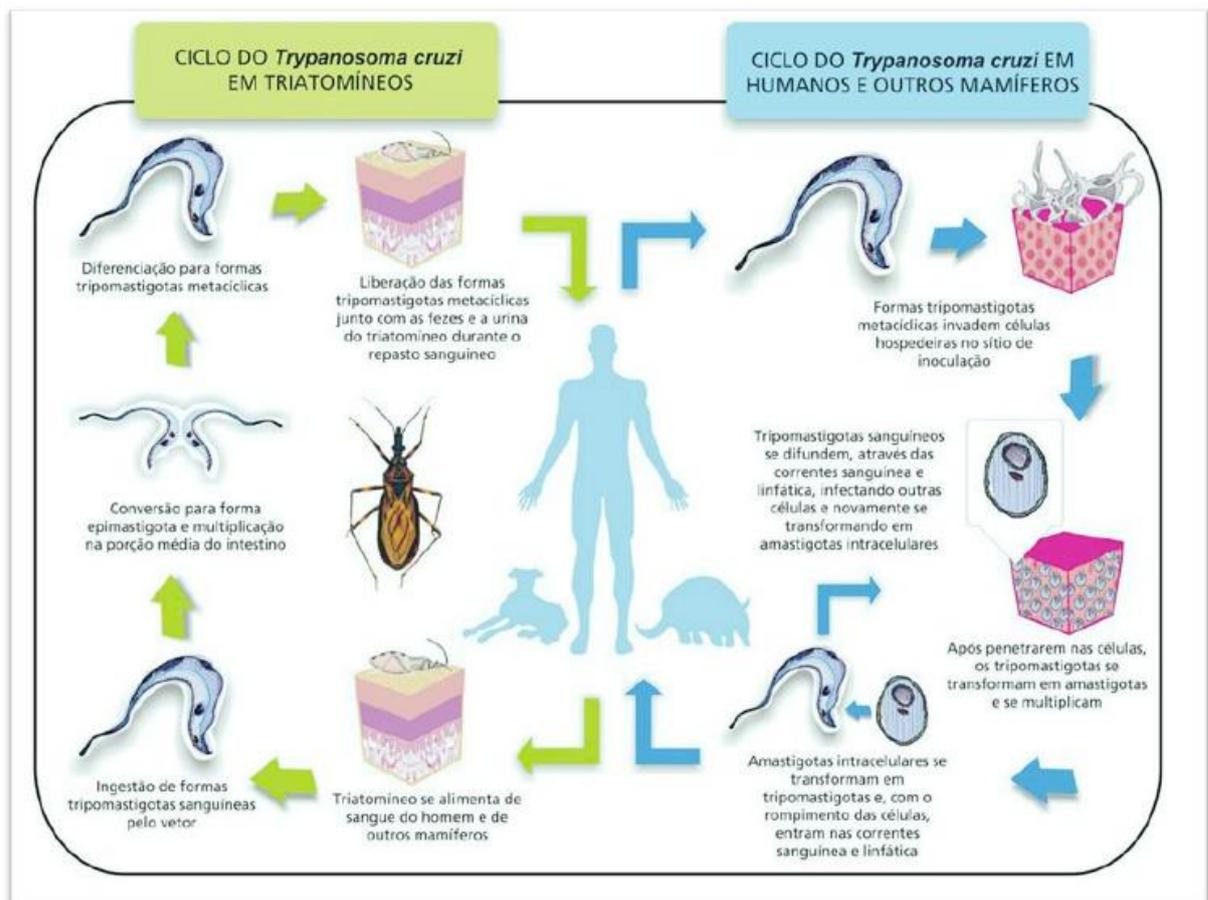
Fonte: adaptado de ECHEVERRIA & MORILLO, 2019

A transmissão vetorial da doença ocorre através da contaminação de triatomíneos por *T. cruzi*, onde os triatomíneos, que têm o hábito de defecar enquanto se alimentam de sangue durante a picada, inoculam o parasito no hospedeiro através das mucosas ou lesões na pele provocadas pelo prurido excessivo no local afetado (DE OLIVEIRA, 2018).

Em seguida, o parasito atinge o hospedeiro humano, invadindo seus tecidos e órgãos, principalmente, o fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, sistema nervoso central (SNC), músculos esqueléticos e cardíacos. A partir de então, ocorre a diferenciação na forma amastigota, que se multiplica rapidamente dentro do tecido (LANDER, CHIURILLO & DOCAMPO, 2021). As formas amastigotas presentes no tecido em grande quantidade, se transformam novamente em sua forma infectante flagelada e provocam a lise celular, invadindo, posteriormente os tecidos adjacentes e se espalhando pelo sistema linfático e corrente sanguínea (DE OLIVEIRA, 2018).

Durante seu repasto sanguíneo, os triatomíneos podem se infectar pelos tripomastigotas presentes na circulação periférica do ser humano. No trato digestivo dos insetos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas. Em seguida ocorre a multiplicação e os epimastigotas se diferenciam novamente na forma infectante no terço final do trato digestivo, saindo pelas fezes dos insetos e completando assim o ciclo biológico do parasito (figura 6) (DE OLIVEIRA, 2018).

Figura 6: Ciclo biológico de *T. cruzi*.



Fonte: adaptado de <https://crid.fmrp.usp.br/>

Conforme dito anteriormente, a DC pode ser transmitida por outros mecanismos, tais como transfusão sanguínea, pela via vertical (congênita) ou pela via oral, onde pode ocorrer a ingestão de alimentos e bebidas contendo as formas infectantes do parasito. Além disso, a infecção pode ocorrer, de forma menos frequente, por acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (NGUYEN & WASEM, 2021).

No Brasil, os meios de transmissão mais frequentes são a vetorial e a via oral. Estudos demonstraram que, ao longo dos anos, os casos de DC reduziram significativamente em todo o

país. Porém, a transmissão oral aumentou significativamente na Região Norte, principalmente, devido à ingestão de açaí e caldo de cana contaminados com o parasito (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014; SANTOS *et al.* 2020).

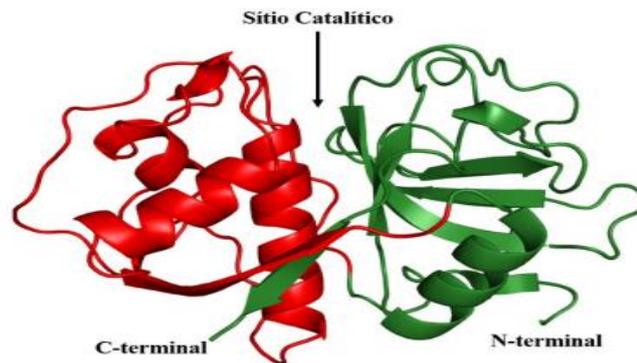
Os tratamentos disponíveis atualmente não possuem a efetividade necessária para tratar a DC em sua fase crônica, ou seja, combater a forma evolutiva amastigota de maneira eficiente, assim se faz necessário a busca por moléculas com potencial tripanocida que possam ser utilizadas como fontes para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas com efetividade na fase crônica da doença (CHATELAIN, 2017).

1.2.1 Principais enzimas do *T. Cruzi*

À medida que o parasito *T. cruzi* passa por ciclos de replicação intracelular, ruptura e invasão, as enzimas metabólicas tornaram-se uma opção de foco em direcionamento das substâncias efetivas, com capacidade inibitória das principais enzimas envolvidas no ciclo de vida do parasito, como por exemplo a cruzaina, TcGAPDH e tripanotiona redutase, consequentemente levando o parasito a morte (MIRANDA; SAYÉ, 2019).

A enzima cruzaina (TcCr) pertence a mesma família de peptidases semelhante a papaína, sendo classificada como a mais abundante e melhor enzima protease caracterizada de *T. cruzi*, essa enzima está presente em todo o ciclo celular do parasito, sendo importante em processos de diferenciação celular no hospedeiro invertebrado conhecido como metaciclogênese, nutrição, reprodução, invasão em células hospedeiras e evasão à resposta imune no hospedeiro vertebrado por meio da clivagem de anticorpos e bloqueio do sistema complemento (DOYLE et al., 2011; PONCE et al., 2013; SCHARFSTEIN, 2018) . Seu sítio catalítico se encontra entre seus dois domínios (folhas - β e hélices- α) figura 7, em seu sítio ativo está presente a chamada tríade catalítica, formada pelos resíduos Cys25, His162 e Asn182.

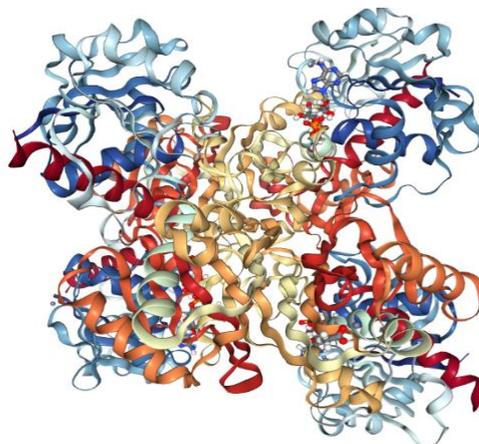
É observado por meio da inibição da cruzaina ocorre um aumento da concentração de compostos no complexo de golgi de *T. cruzi*, o que está relacionado à degradação de compostos tóxicos ao parasito, favorecendo assim a morte do parasito (ENGEL et al., 2000; MOREIRA et al., 2017).

Figura 7: Cruzaína.

Fonte: SOUZA, 2007.

Legenda: Representação da estrutura da cruzaína. Em vermelho, o domínio predominantemente formado por hélices- α ; e em verde, o domínio formado predominantemente por folhas- β .

Outra enzima de interesse para o desenvolvimento de substâncias antichagásicas é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase mais conhecida como TcGAPDH (figura8), ela é essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3- bifosfoglicerato na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa, sendo a principal enzima da via glicolítica *de T.cruzi*. Como descrito na literatura as ações do parasito são dependentes prioritariamente de glicólise para a obtenção de energia, sua inibição causa a morte celular por meio do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (CHELESKI et al., 2011).

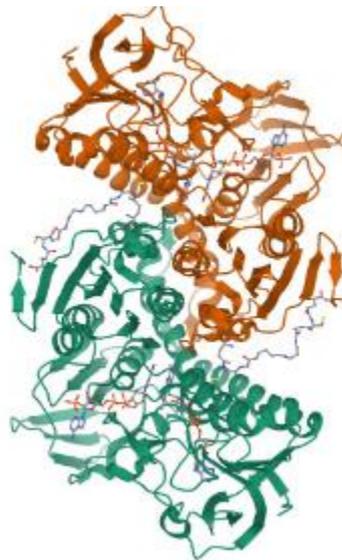
Figura 8: GAPDH

Fonte: <https://www.sinobiological.com/resource/gapdh/proteins>.

Está presente no glicossoma dos parasitos e, quando bloqueada, provoca redução drástica da síntese de ATP, além do acúmulo de mediadores oxidantes tóxicos para a célula (MAUGERI; CANNATA; CAZZULO, 2011). Além disso, Engel e colaboradores, mostraram que a forma amastigota de *T. cruzi*, *in vitro*, possui metabolismo essencialmente glicolítico. Foi visto que a inibição dessa enzima provoca a redução do fluxo glicolítico em 50% (OPPERDOES , 1987).

A enzima tripanotiona redutase (figura 9), tem como principal funcionalidade o equilíbrio do balanço redox em *T. cruzi*, levando a redução dos níveis de radicais livres e contribuindo para a manutenção do parasito representando o principal mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo o que é importante pois durante a resposta imune mediada contra *T. cruzi*, macrófagos e neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (EROS) como mecanismo de defesa contra agentes infecciosos (PIACENZA; TRUJILLO; RADI, 2019). Nos mamíferos este balanço redox é realizado via glutaciona/glutaciona redutase, sendo equivalente ao sistema tripanotiona/tripantionia redutase dos mamíferos (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2019). Dessa forma, essa enzima também constitui um importante alvo no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o desenvolvimento de moléculas antichagásicas.

Figura 9: Tripanotiona redutase



Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/4adw>

1.4 Peptídeos antimicrobianos como modelo para o desenvolvimento de medicamentos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são proteínas de baixo peso molecular, com 12 a 50 resíduos de aminoácidos, que apresentam atividade antimicrobiana e imunomoduladora de amplo espectro contra bactérias (gram positivo e negativo), vírus e fungos. O primeiro PAM a ser descoberto, em 1939, foi chamado de gramicidina e derivou da bactéria *Bacillus brevis* apresentando atividade antibacteriana contra gram positivas. A partir daí, deu-se início ao estudo desses peptídeos, que, nos últimos anos, são catalogados em grande quantidade, pois ganharam crescente interesse entre cientistas, profissionais de saúde e empresas farmacêuticas devido ao seu potencial terapêutico. Estima-se que mais de 60 substâncias peptídicas estão no mercado farmacêutico e centenas de novos peptídeos estão passando por ensaios pré-clínicos e clínicos (BOPARAI & SHARMA, 2020; HAFEEZ *et al.* 2021; LUO & SONG, 2021).

A classificação dos PAMs se dá de acordo com as suas propriedades físico-químicas tais como momento hidrofóbico, hidrofobicidade, carga líquida, conteúdo estrutural secundário e solubilidade (BOPARAI & SHARMA, 2020). Estudos mostraram que, devido apresentarem diferentes propriedades e composições estruturais, podem atuar por diversos mecanismos nas membranas plasmáticas (LI, DING & MA, 2016).

A estrutura dos PAMs apresenta cadeias laterais hidrofóbicas e hidrofílicas, que conferem a característica de hidrofobicidade à essas moléculas. Parâmetro como o momento hidrofóbico (μH), são classificados como ferramenta relevante na anfipicidade das moléculas. Dessa forma, juntamente com a hidrofobicidade (H) e a carga líquida (z) dos peptídeos, são de grande importância para a avaliação de estudos da análise racional de interações peptídeo-membrana e mecanismo de ação dessas moléculas (EISENBERG *et al.* 1982; DRIN & ANTONNY, 2010; TEIXEIRA, FEIO & BASTOS, 2012).

As alterações na hidrofobicidade de sequências de aminoácidos estão intimamente ligadas a sua capacidade de ultrapassar membranas lipídicas, podendo esses resíduos de aminoácidos classificados de acordo com seus grupos de cadeias laterais em hidrofóbicos, hidrofílicos carregados, e hidrofílico sem carga. De acordo com Wieprecht *et al.* (1997), o aumento do μH de um peptídeo potencializa a sua permeabilização. Isso se deve ao fato de haver um aumento da afinidade do peptídeo com a estrutura membranar (TOSSI, 2000; SUN *et al.* 2018).

O aprimoramento da atividade dos PAMs é realizado através do aumento da sua eficácia, aumento da especificidade, redução das interações medicamentosas, diminuição da toxicidade, bem como pela sua diversidade biológica e possibilidade do desenho racional do peptídeo

através da substituição de seus aminoácidos. Alterações sutis realizadas nessas unidades proteicas podem acarretar mudanças funcionais, que afetam a capacidade desses peptídeos de agir em microrganismos, além de alterar a sua toxicidade na célula hospedeira (FRY, 2018; TORRES, 2019). De acordo com Pedron (2020), essas características dos aminoácidos estão relacionadas com o mecanismo de ação dos PAMs e podem ser modificadas por meio da mutagênese sítio-dirigida, ou seja, excluindo ou substituindo resíduos de aminoácidos com o objetivo de direcionar a atividade de peptídeos já existentes. Como por exemplo a substituição de aminoácido pela arginina no VmCT1, peptídeo análogo derivado do veneno do escorpião, que foi capaz de aumentar a seletividade do peptídeo ao parasito em três vezes (PEDRON, 2020).

Os resíduos de aminoácidos que predominam, na maioria dos peptídeos antimicrobianos, são os de arginina (Arg) e lisina (Lys). A carga positiva dos grupos guanidínio e amino de Arg e Lys, respectivamente, são responsáveis pela interação dos peptídeos com membranas negativamente carregadas, a exemplo da membrana parasitária (TOSSI, 2006; LOHNER, 2009).

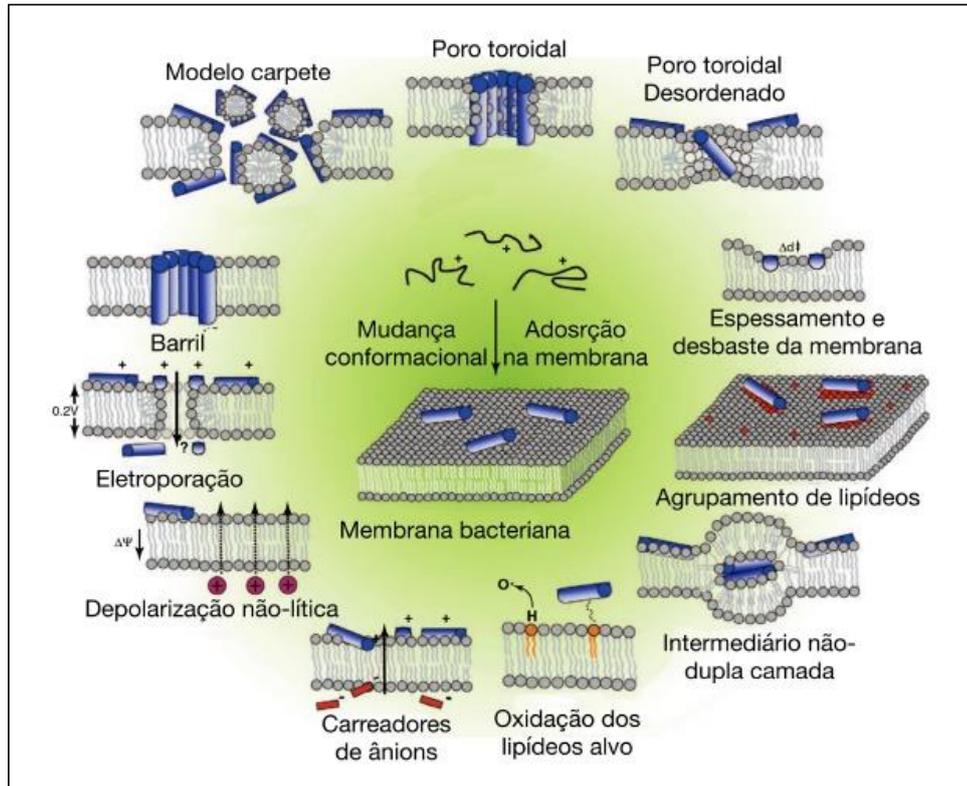
O resíduo mais comumente utilizado no desenho de PAMs é o de Arg, pois são aqueles mais abundantes, além de apresentarem maior efetividade na permeabilização das membranas (BAHNSEN *et al.*, 2013; HRISTOVA e WIMLEY, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2012). Os resíduos ricos em Arg tendem a atuar através de mecanismos transmembrânicos, ou seja, penetram as células mais facilmente devido ao favorecimento energético da inserção dos grupos guanidínio em ambientes hidrofóbicos (NAKASE *et al.*, 2012; MOON & FLEMING, 2011; RICE & WERESZCZYNSKI, 2017). O resíduo de Lys é descrito, por alguns trabalhos, como responsável direto da alta atividade antimicrobiana dos peptídeos. Além disso, os PAMs com maior quantidade de resíduos de Lys também tendem a atuar por mecanismos de permeabilização das membranas dos microrganismos (SCHIBLI *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2011; ZAMORA-CARRERAS *et al.*, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos de origem natural variam em cationicidade, indo de 0 a mais de 20 cargas positivas. Sabe-se que os peptídeos com maior atividade se enquadram na faixa intermediária (+3 a +6 cargas líquidas). É importante ressaltar que a carga positiva de um PAM é fundamental para garantir as interações eletrostáticas iniciais da molécula com as biomembranas, visto que a estrutura membranar é rica em moléculas carregadas negativamente, o que promove a atração entre elas (EPAND & EPAND, 2009; TORRES, 2019). O mecanismo de ação dos peptídeos é determinado justamente por esse tipo de interação, onde as moléculas de PAMs, após interação inicial com a membrana, pode promover o rompimento membranar

ou ser internalizada nas células (TORRES, 2018). A estrutura e a conformação assumida pelo peptídeo durante o contato com a membrana é uma das chaves determinantes para atividade antimicrobiana. As tendências estruturais predominantes são as em α -hélice e as estruturas folha- β (HUANG, HUANG & CHEN, 2010; MORAVEJ *et al.* 2018).

Os mecanismos de ação dos PAMs são diversos (Figura 10), sendo o mais comuns os denominados ripas de barril; carpete e poro toroidal. De forma resumida o mecanismo de ripas de barril é caracterizado pela interação da face hidrofóbica do PAM com as cadeias carbônicas dos lipídeos presentes na membrana plasmática, proporcionando a exposição da face hidrofílica compondo um canal transmembranar, já o mecanismo de carpete é caracterizado por uma interação eletrostática que ocorre inicialmente entre os resíduos com carga positiva do PAM com as cargas negativas dos fosfolipídeos da célula microbiana, posteriormente ocorre um acúmulo desses PAMs na superfície da membrana plasmática formando a semelhança com um carpete, podendo causar a permeabilização, por fim o modelo de poro toroidal é caracterizado pela união paralela entre PAM e membrana fosfolipídica por meio da interação eletrostática. Dessa forma, o peptídeo separa as cabeças polares dos fosfolipídeos e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro. Assim, neste modelo, o lúmen do poro é formado por moléculas de peptídeos e cabeças polares dos fosfolipídeos intercaladas (Toke, 2007; Taylor, 2009; LOHNE, 2017).

Figura 10. Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos



Fonte: adaptada de NGUYEN, HANEY & VOGEL, 2011.

Os peptídeos podem entrar no citoplasma através da penetração direta ou endocitose da membrana plasmática, levando, então, a realização de suas atividades intracelulares, tais como inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, ligação a ácidos nucleicos e alteração direta do ciclo celular (PARK et al. 2018; LUO & SONG, 2021). Além disso, os PAMs regulam a resposta imune e desempenham papel importante na defesa do organismo. Outras funções dessas moléculas são a indução de síntese de fatores pró-inflamatórios, redução da reação inflamatória causada por endotoxinas, regulação da imunidade adaptativa e manutenção da homeostase do organismo (LEI *et al.* 2019).

Os venenos de invertebrados constituem uma rica fonte de PAMs. Após anos de pesquisa para melhorar as propriedades peptídicas e estratégias de entrega, vários peptídeos já estão sendo utilizados na prática clínica (UPERT, 2021; CHEN, 2020). Alguns exemplos de peptídeos de invertebrados incluem aqueles encontrados em insetos (defensinas e cecropinas),

moluscos e nematóides (defensinas), caranguejos-ferradura (grandes defensinas), β -defensinas de invertebrados e crustáceos (crustinas) (HAFEEZ *et al.* 2021)

Os diversos modos de ação dos PAMs sobre protozoários e a prospecção de novos PAMs isolados de artrópodes venenosos com potencial terapêutico, tornaram esses peptídeos ferramentas interessantes para a busca de novos agentes clínicos utilizados no tratamento de doenças transmitidas por protozoários (JÚNIOR, 2019) .

Nas últimas décadas, os PAMs vem sendo evidenciados devido a sua atividade antichagásica, a exemplo das catelicidinas, batroxidina (MELLO *et al.*, 2017), crotalicidina (BANDEIRA *et al.*, 2017) e a dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a derivada do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* (LIMA *et al.*, 2018). Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos de origem animal podem ser utilizados em modelos de estudos pré-clínicos para a descoberta de fármacos promissores à doenças com tratamento pouco eficaz, como a doença de Chagas.

1.5 Dinoponeratoxinas

A espécie *Dinoponera quadriceps* (figura 11), pertencente à subfamília *Poneriane*, é uma formiga primitiva de grande tamanho (3 cm) distribuída no nordeste brasileiro (PAIVA & BRANDÃO, 1995). Esses animais são caracterizados por serem, em sua maioria, predadoras, alimentando-se de pequenos e médios artrópodes. Sua picada é responsável por provocar dor intensa com duração de até 48 horas (ARAÚJO & RODRIGUES, 2006; NORMAN *et al.* 2019).

Figura 11. *Dinoponera quadriceps*.



Fonte: adaptado de <https://www.pbase.com/cranter/dinoponera>

Os venenos de formigas são compostos por substâncias, como toxinas, proteínas, peptídeos, hidrocarbonetos, alcaloides, aminoácidos livres, aminas biogênicas, ácido fórmico, sais e açúcares, o que os confere uma diversidade de potencialidades terapêuticas (TORRES, 2013; YACOUR, 2020). O veneno da *Dinoponera quadriceps* possui conteúdo proteico de 64% (SOUSA *et al.*, 2016), sendo a fonte das dinoponeratoxinas (Dntx), que são os peptídeos isolados do veneno total da *Dinoponera quadriceps*.

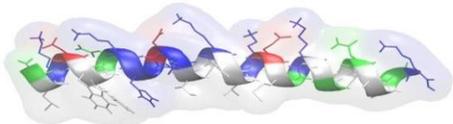
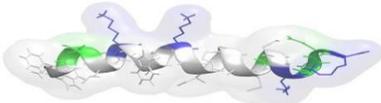
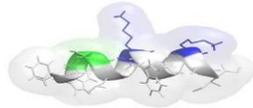
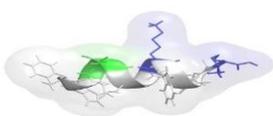
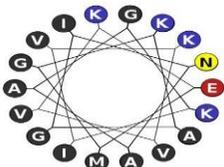
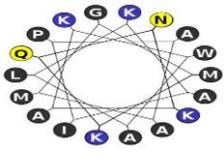
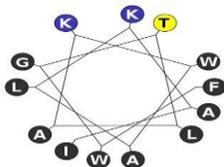
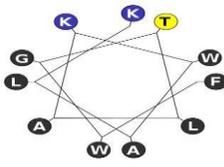
Diferentes efeitos terapêuticos foram descritos na literatura atribuídos aos PAMs derivados da *Dinoponera quadriceps*, (tabela 1). Como por exemplo o efeito antimicrobiano (ROCHA, 2021), antifúngico (DODOU, 2020), antichagásico (LIMA, 2018) e o efeito anticonvulsivante (NÔGA *et al.* 2016)

Estudos proteômicos evidenciaram quatro peptídeos no veneno de *D. quadriceps*: Dq-3348, Dq-2561, Dq-1503 e Dq-1319 (BANDEIRA LIMA *et al.*, 2018). As DnTx foram denominadas de acordo com seu peso molecular teórico ou experimental e por uma nomenclatura normalizada: (M-PONTXDq3a; 23 resíduos de aminoácidos), (M-PONTXDq3b; 13 resíduos de aminoácidos), (M-PONTX-Dq3c, 11 resíduos de aminoácidos) e (MPONTX-Dq4e; 30 resíduos de aminoácidos). Dentre os diferentes PAMs com atividade antichagásica, M-PONTX-Dq3a foi identificado como um peptídeo promissor contra as principais formas evolutivas de *T. cruzi*, possuindo, assim, o maior índice de seletividade (IS) (BANDEIRA LIMA *et al.*, 2017).

Dessa forma, baseando-se em estudos anteriormente citados, o M-PONTX-Dq3a mostrou grande potencial como modelo estrutural para a busca de novos PAMs, por meio de tentativas

direcionadas que visam diminuir a sequência de aminoácidos, aumentar a seletividade, diminuir a toxicidade e reduzir o custo de produção

Tabela 1. Dinoponeratoxinas naturais encontradas e *D. quadriceps*

Dinoponeratoxina (nomenclatura normalizada)	(M-PONTX-Dq4e)	(M-PONTX-Dq3a)	(M-PONTX-Dq3b)	(M-PONTX-Dq3c)
Estrutura primária	GLKDWWNKHKDKIVKVVKEMGKAGINAAGK	FWGTLAKWALKAI PAAMGMKQNK	FWGTLAKWALKAI	FWGTLAKWALK
Peso molecular ^b	3348,97 (3350,02)	2561,13 (2562,16)	1503,83 (1504,85)	1319,59 (1320,61)
Predição de modelo ^c				
Carga líquida (z) ^d	6,1	5,0	3,0	3,0
pI ^d	10,9	14,0	14,0	14,0
Hidrofobicidade, H ^e	0,148	0,509	0,823	0,781
μ _H ^e	0,458	0,248	0,531	0,523
Roda α-helicoidal ^e				

Legenda: Legenda: Peptídeos amidados C-terminal; bMassa molecular experimental e teórica entre parenteses respectivamente; c Predição de modelo arquivado com o servidor PEP-FOLD 2 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>); dCarga líquida em pH e pI neutro, calculado por <http://pepcalc.com>; eFrom <http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>, com resíduos carregados negativamente em vermelho, positivamente em azul, não polares em preto e polares em amarelo; μ_H = momento hidrofóbico;

Fonte: adaptado de Bandeira Lima *et al.*, 2018.

2. Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é uma antroponose originária do continente americano que se espalhou para todos os continentes por meio do processo migratório populacional. Atualmente é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das principais doenças tropicais negligenciadas (OMS, 2018). A infecção por essa doença provoca sérios impactos sociais, políticos e econômicos, pois podem ocasionar incapacidades nos portadores da doença (ANDRADE; ROCHA, 2015). Estima-se que os gastos globais com a doença de Chagas excedam os 7 bilhões de dólares anuais, valor que supera os gastos com doenças mais conhecidas mundialmente. Apesar de ser considerada uma doença tropical, por sua maioria de casos estar concentrada na América Latina, o impacto econômico dessa doença se mostrou significativo em áreas onde ela não é tradicionalmente um risco, como na América do Norte e a Europa sendo responsável por alta porcentagem em gastos com saúde (LEE, 2013; SANTOS *et al.* 2020).

Atualmente, no Brasil, existe apenas uma opção de tratamento disponível para DC, o medicamento chamado benznidazol, que é utilizado há mais de 50 anos para essa condição, apesar de apresentar eficácia limitada. O benznidazol apresenta eficácia em 80% dos casos diagnosticados na fase aguda da doença, e 20% na fase crônica. Ao longo dos anos, surgiram cepas resistentes ao benznidazol, tornando ainda pior o prognóstico de alguns pacientes, já que seu tratamento medicamentoso se restringe a uma única opção terapêutica (RODRIGUES *et al.*, 2014; NGUYEN & WASEM, 2021).

A infecção aguda, geralmente, se resolve espontaneamente. No entanto, 20% a 40% dos pacientes desenvolvem cardiomiopatia após 30 anos, convivendo com a doença. A progressão da cardiomiopatia é rápida, manifestando-se com insuficiência cardíaca e morte súbita (ECHEVERRIA & MORILLO, 2019).

Além dos diversos efeitos colaterais causados pelo uso do benznidazol, o tratamento é contraindicado para pacientes com insuficiência renal ou hepática, bem como é proibido para mulheres grávidas (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Ademais, permanece incerto se esse fármaco pode prevenir ou aliviar a doença cardíaca crônica, que é a principal complicação da doença de Chagas (MORILLO *et al.*, 2015). Assim, existe uma necessidade urgente de buscar novas alternativas terapêuticas para a DC (CHATELAIN, 2017).

Na busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas, os PAMs tem se destacado, pois são peptídeos antimicrobianos que fazem parte da imunidade inata dos animais e foram selecionados por meio da sobrevivência, muitos desses peptídeos possuem atividade bactericida, fungicida e antichagásica. Os PAMs permitem a técnica de design racional, ou seja por meio de modificações em sua estrutura é possível obter novos peptídeos com melhorias em sua atividade já estabelecidas (LAKSHMAIAH NARAYANA; CHEN, 2015; JIN et al., 2016).

Previamente, foi descrito o efeito tripanocida dos PAMs do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, as dinoponeratoxinas (CHATELAIN, 2017). Dentre eles, M-PONTX-Dq3a foi identificado como o peptídeo mais promissor com atividade *in vitro* superior ao benznidazol, medicamento atual utilizado para o tratamento para a doença de Chagas (LIMA, 2018). Porém algumas peculiaridades como o tamanho da cadeia de aminoácido, o tempo e custo de produção de M-PONTX-Dq3a podem dificultar a sua utilização *in vivo*. Assim o presente trabalho visa por meio da fragmentação peptídica e design racional analisar a atividade antichagásica de fragmentos e análogos da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a na busca de substâncias com potencial biotecnológico.

3. Objetivos

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver melhores peptídeos tripanocidas derivados da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.Realizar estratégias de design racional dos peptídeos selecionar os promissores em análise computacional.
- 2.Avaliar a citotoxicidade dos fragmentos e análogos do peptídeo M-PONTX-Dq3a sobre as células hospedeiras
- 3.Avaliar o efeito tripanocida dos fragmentos e análogos do peptídeo M-PONTX-Dq3a sobre a forma tripomastigota e calcular o índice de seletividade.
4. Selecionar os peptídeos que apresentam IS semelhante ou superior ao M-PONTX-Dq3a
5. Investigar o mecanismo de ação dos peptídeos considerados mais promissores

4. Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Substâncias em Estudo

No presente trabalho foram testados fragmentos e análogos da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a. Estratégias de desenho estrutural foram realizadas no intuito de selecionar as características físico-químicas mais importantes para atividades biológicas.

Foram realizadas análises teóricas de fragmentos de M-PONTX-Dq3a e substituições de aminoácidos em diferentes posições. Primeiramente, valores teóricos de propriedades físico-químicas como dados de hidrofobicidade, carga líquida positiva e tendência helicoidal foram extraídas com o auxílio dos softwares “Peptide property calculator” (<http://www.pepcalc.com>) e “Heliquest” (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (GAUTIER et al., 2008). Em seguida, os peptídeos promissores foram sintetizados em fase sólida.

4.2 Síntese e Purificação dos peptídeos

A síntese e purificação foi realizada no laboratório de compostos bioativos da Universidade Federal do ABC-UFABC, sob coordenação do Prof. Vani Xavier de Oliveira Junior e no Laboratório de Química de Peptídeos y Proteínas do Centro de Investigación Príncipe Felipe, coordenado pela Dra. Mar Orzaéz, Valencia-Espanha.

A síntese de peptídeos em fase sólida foi realizada em um sintetizador de peptídeos (PS3-Sync Technologies/ Libertyblue), utilizando a estratégia fluorometiloxicarbonil (Fmoc), e os peptídeos foram ancorados a uma resina Rink Amide, com grau de substituição de 0,52 mmol g⁻¹. A peptidil-resina protegida a seco foi clivada por exposição a TFA/anisol/água (95:2,5:2,5, v:v:v) durante 2 h à temperatura ambiente (Torres , 2017) . Os peptídeos brutos foram precipitados com éter dietílico anidro, separados dos componentes da reação solúveis em éter por filtração, extraídos da resina com acetonitrila 60% em água e liofilizados (Pedron, 2016) . Os peptídeos brutos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa semi-preparativa em um Delta Prep 600 (Waters Associates) e as frações selecionadas contendo os peptídeos purificados foram reunidas e liofilizadas. Os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas por ionização por cromatografia líquida usando um espectrômetro de massa Modelo 6130 Infinity acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Modelo 1260 (Agilent) (Torres , 2017) .

Os peptídeos obtidos foram denominados M-PONTX-Dq3a [1-15], M-PONTX-Dq3a [3-15], M-PONTX-Dq3a [12-23], [Lys]³ M-PONTX-Dq3a [1-15], [Lys]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15],[Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15], (tabela 2) todas as substituições foram realizadas nas posições hidrofílicas.

Tabela 2: Fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a.

Peptídeo	Seqüência	Classificação
M-PONTX-Dq3a (Lima, 2018)	FWGTLAKWALKAIPAAMGMKQNK	Peptideo parental
M-PONTX-Dq3a [1-15]	^a FWGTLAKWALKAIPA	Fragmento
M-PONTX-Dq3a [3-15]	^b GTLAKWALKAIPA	Fragmento
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^c FWKTLAKWALKAIPA	Análogo
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^d FWGKLAKWALKAIPA	Análogo
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^e FWGTLAKWAKKAIPA	Análogo
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^f FWRTLAKWALKAIPA	Análogo
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^g FWGRLAKWALKAIPA	Análogo
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^h FWGTLARWALKAIPA	Análogo
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	ⁱ FWGTLAKWARKAIPA	Análogo
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15]	^j FWGTLAKWALRAIPA	Análogo

Legenda: (a) fragmento de M-PONTX-Dq3a na fragmentação na posição 15; (b) fragmento de M-PONTX-Dq3a na fragmentação na posição 3 e 15; (c) análogo por substituição por lisina na posição 3 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15]; (d) análogo por substituição por lisina na posição 4 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15];(e) análogo por substituição por lisina na posição 10 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15]; (f) análogo por substituição por arginina na posição 3 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15];(g) análogo por substituição por arginina na posição 4 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15]; (h)análogo por substituição por arginina na posição 7 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15];(i) análogo por substituição por arginina na posição 10 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15];(j) análogo por substituição por arginina na posição 11 do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15].

4.3 Ensaio *in vitro*

4.3.1 Cultivos de parasitos e de células de mamíferos

As células epiteliais de rim de macaco LLC-MK2, a cepa Y de epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* foram gentilmente doados pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitas (Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

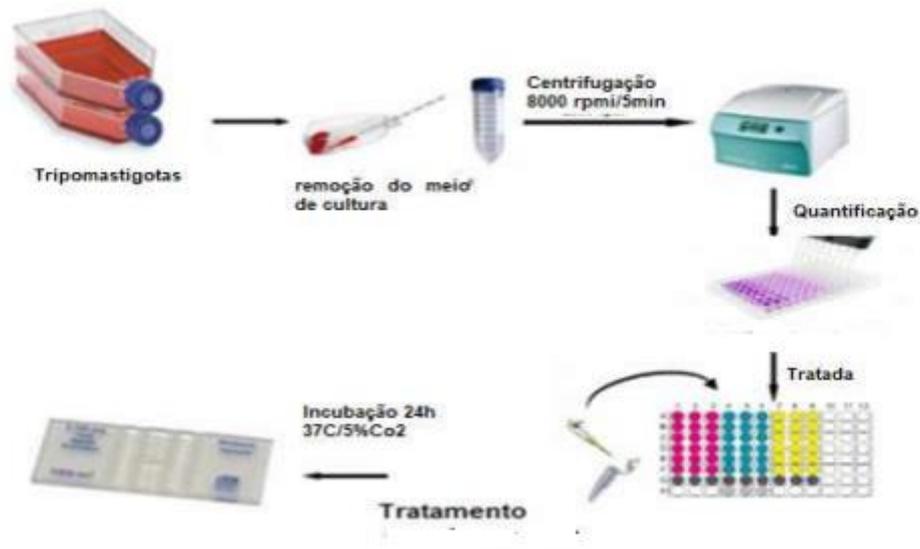
As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (Liver infusion tryptose) de acordo com Camargo (1964), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução de antibiótico (penicilina/estreptomicina, Sigma, Brasil) e mantidos a 28°C em incubadora B.O.D (Fanem, Brasil). Os parasitos utilizados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

As formas tripomastigotas foram obtidas por infecção de células LLCMK2. As células foram cultivadas (2×10^5 / mL) em meio DMEM (*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 DMEM 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.

4.3.2 Avaliação do efeito dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a sobre as formas tripomastigota de *T. cruzi*

Com o objetivo da análise do efeito antichágasico dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em relação a forma evolutiva responsável pela infecção da DC foram utilizadas culturas de formas tripomastigotas obtidas a partir do sobrenadante de células LLCMK2 infectadas e foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 cél/mL em placa de 96 poços em meio DMEM 2% suplementados com soro bovino fetal e tratados com diluições de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a (concentração variando de 12,5 a 0,19 μ mol L⁻¹ de peptídeo), ou com tratamento com PBS (grupo controle) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (figura 12). A viabilidade foi determinada após 24 horas por quantificação em câmara de Neubauer e realizado o cálculo da EC₅₀ (concentração letal para 50% das células). Os valores de EC₅₀ foram determinadas por regressão não linear com intervalo de confiança 95%.

Figura 12. Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.3 Avaliação da toxicidade dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em células de mamíferos LLCMK2

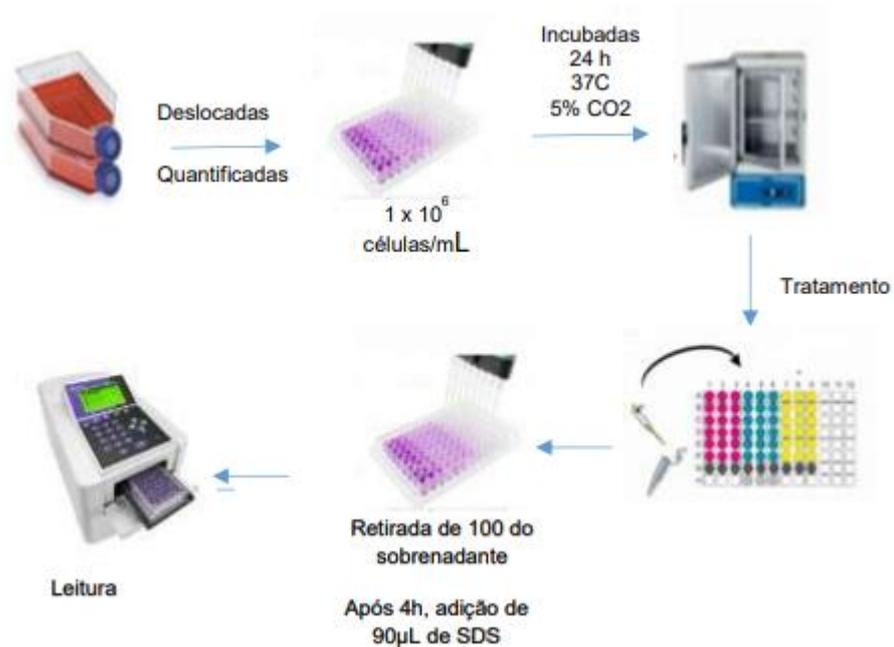
O potencial de citotoxicidade dos fragmentos e análogos do peptídeo M-PONTX-Dq3a sobre a linhagem LLC-MK2 teve o propósito de selecionar as concentrações que foram testadas nos outros experimentos, bem como permitir o cálculo do índice de seletividade, proporcionado a relação de toxicidade do peptídeo testado ao parasito e a célula hospedeira da forma evolutiva intracelular (amastigota).

As células LLCMK2 foram subcultivadas em placas de microcultura em meio DMEM 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 fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a (100 a 1,56 μ mol L⁻¹ de peptídeo, após 24 h, a absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro para microplacas (Asys Expert Plus, Biochrom, EUA) (figura 13). O valor da EC₅₀ foi estimado e o Índice de Seletividade (SI) calculado com o objetivo de comparar a citotoxicidade entre células de

mamíferos e parasitos. O IS é calculado a partir da seguinte fórmula: % cel infectadas x n° amastigotas/células (Vendrametto *et al.*, 2010).

Figura 13. Representação esquemática do ensaio para determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre células hospedeiras LLC-MK2.

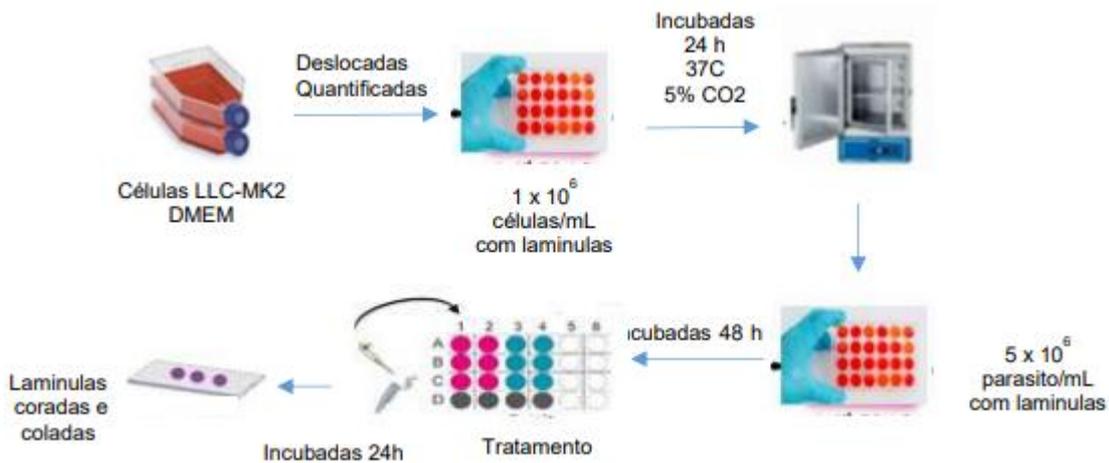


Fonte. Elaborado pela autora

4.3.4 Avaliação do efeito do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre as formas amastigotas intracelulares.

Com o objetivo de investigar o efeito dos peptídeos em relação as formas evolutivas responsáveis pela cronificação da doença, foram escolhidos os que tiveram o índice de seletividade semelhante ou superior ao peptídeo parental, assim foram avaliados os efeitos do fragmento M-PONTX-Dq3a [1-15] e do análogo [Lys]³- M-PONTX-Dq3a[1-15] nas formas amastigotas. 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 e 48 horas foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos selecionados ou sem tratamento e após o período de incubação as lamínulas foram lavadas, fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa para seguinte montagem em lâminas (ADADE *et al.*, 2011) (figura 14). 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.

Figura 14. Representação esquemática do ensaio para avaliação do efeito dos peptídeos testados sobre formas amastigotas de *T. cruzi*.

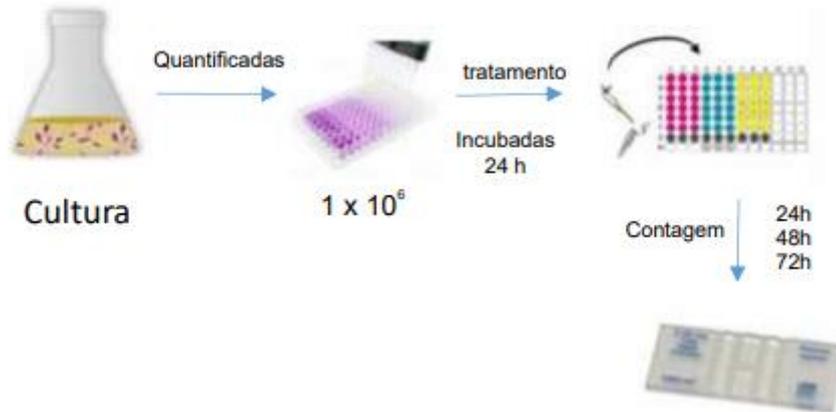


Fonte. Elaborado pela autora.

4.3.5 Avaliação do efeito fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas conforme item anterior e, após atingirem a fase exponencial de crescimento, os parasitos foram subcultivados em meio LIT na concentração de 1×10^6 cél/mL em placa de 96 poços e tratados com diferentes concentrações dos peptídeos M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] em concentrações de diluição variando de 100 a $0,78 \mu\text{M}$. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas (BECERRA *et al.*, 2012) em estufa B.O.D a 28°C , avaliados por contagem direta em câmara de Neubauer e calculado a EC_{50} (concentração inibitória para 50% das células) (figura 15). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 15. Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte. Elaborada pela autora.

4.3.6 Determinação da integridade da membrana do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] por citometria de fluxo.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com a EC₅₀ de M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] por 24 horas e após este período as culturas foram centrifugadas, lavadas com PBS pH 7,4 e ressuspensas em tampão de ligação (Hepes/NaOH 10Mm, NaCl 140Mm, CaCl₂ 2,5 Mm, pH 7,4). Em seguida foram incubadas com uma solução de 7-AAD (1mg/ mL, Sigma - Aldrich), células com marcação para 7-AAD são consideradas células necróticas, por perda de integridade de membrana e Anexina V-FITC (50µg/ mL, Becton-Dickinson), essa é usada para avaliar a externalização de fosfatidilserina como marcador de apoptose por 15 min (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). Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Os resultados foram expressos em percentual de eventos positivos. Os epimastigotas tratados com PBS foram usados como controles negativos e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.7 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] por citometria de fluxo.

A avaliação das possíveis alterações no potencial transmembrânico foi realizada utilizando o marcador rodamina 123 (Rho 123), caracterizado por ser um corante lipofílico que em condições fisiológicas se acumula no interior das mitocôndrias. Caso ocorra lesão mitocondrial irá ser observado um menor acúmulo de rodamina. Para as análises, epimastigotas foram incubados com EC_{50} dos peptídeos M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]³ - M-PONTX-Dq3a[1-15] por 24 horas e após esse período as culturas foram centrifugadas, lavadas e marcadas com rodamina 123 (10µg/ mL; invitrogen) por 15min. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas e então a leitura realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

4.3.8 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] por citometria de fluxo.

Para a avaliação de EROs, utilizou-se o marcador DCF para a citometria de fluxo. Este marcador na presença de EROs, apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência. Dessa forma, a fluorescência observada aumenta proporcionalmente à produção de EROs. As formas epimastigotas (1×10^6 células/mL) foram plaqueadas, tratadas nas concentrações com EC_{50} dos peptídeos M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]³ - M-PONTX-Dq3a[1-15] e incubadas por 24 horas em placa de 24 poços em estufa de BOD a 28 °C. Células tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo. Após esse período as células foram lavadas e marcadas com DCF (2',7'-diclorofluoresceína) por 30 minutos no escuro. Ao final, os parasitos foram lavados novamente e colhidos para análise por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

4.3.9 Análises ultraestruturais do fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] por Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As formas epimastigotas foram tratadas com os valores EC_{50} de M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]³ - M-PONTX-Dq3a[1-15] e incubadas por 12 h em estufa de BOD a 28 °C. Após a incubação, os parasitos foram fixados por 2 horas com 2,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavados duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada centrifugando-se a 800g por 10 min.

Em seguida, as amostras foram desidratadas e séries crescentes de etanol (30-100%), colocadas em lamínulas de vidro, fixadas a 37°C com 5% de CO₂, cobertas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, USA)

(MELLO et al., 2017). As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0.

4.3.10 Verificação da possível interação entre o fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e análogo e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] com as enzimas de tripanossomatídeos por docking molecular.

As simulações de docking molecular foram realizadas pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica da UECE, coordenado pelo Prof. Dr. Emmanuel Marinho.

Previamente, despertou interesse na comunidade científica a identificação de alvos enzimáticos vitais para os parasitos como estratégia na busca de novas terapêuticas. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), a cruzaina, a superóxido dismutase e a tripanotiona redutase são alvos para o desenvolvimento de inibidores do parasito causador da doença de Chagas (MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

Para investigar o efeito antichagásico dos peptídeos frente aos principais alvos enzimáticos do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, a enzima TcGAPDH, Tripanotiona redutase e Cruzaina, foram obtidas as coordenadas tridimensionais das estruturas proteicas no banco de dados *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>).

A estrutura cristalina obtida do complexo Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* com o inibidor co-cristalizado chalepina (PDB 1K3T), foi depositada no Protein Data Bank com uma resolução de 1.95 Å, sendo determinada por Difração de Raios-X. (PAVÃO et al, 2002).

A estrutura obtida da enzima Tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* complexada com o inibidor Quinacrine mustard (PDB 1GXF), foi depositada com uma resolução de 2.70 Å, determinada por Difração de Raios-X. (SARAVANAMUTHU et al, 2004).

No caso da enzima cruzaina, a estrutura cristalina obtida (PDB 3IUT) está complexada com o inibidor Tetrafluorophenoxymethyl ketone, depositada com uma resolução de 1.20 Å, sendo determinada por Difração de Raios-X (BRAK et al., 2010).

4.3.10.1 Predição da estrutura 3d dos peptídeos

A predição das estruturas tridimensionais (3D) dos peptídeos foi realizada no servidor web I-TASSER (ZHANG, 2009), baseada na sequência primária dos peptídeos.

4.3.10.2 Docking Molecular

Após a predição da estrutura, foram realizadas simulações de docking molecular dos peptídeos com as principais enzimas envolvidas no ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (Cruzaína, Tripanotiona redutase e TcGAPDH), utilizando o servidor ClusPro 2.0 (COMEAU *et al.*, 2004), inserindo as opções padrões, sem restrições entre as moléculas, realizando uma busca exaustiva pelo espaço rotacional e translacional utilizando PIPER (KOZAKOV *et al.*, 2006), programa que se baseia no método de transformada rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*), cuja função de pontuação é descrita como

$$E = w_1 E_{\text{attr}} + w_2 E_{\text{rep}} + w_3 E_{\text{elec}} + w_4 E_{\text{DARS}} \quad (1)$$

onde os componentes E_{attr} e E_{rep} representam, respectivamente, os termos de atração e repulsão da energia de interação de van der Waals; E_{elec} representa o termo eletrostático; E_{DARS} é um potencial estatístico baseado em um conjunto de conformações de complexos de proteínas obtidas de dados experimentais de docking, apresentando boa complementariedade da forma; os coeficientes w_1 , w_2 , w_3 e w_4 representam os pesos de seus respectivos termos.

O ClusPro 2.0 visa encontrar o complexo de proteínas mais próximo da estrutura nativa, realizando o agrupamento de mil (1.000) conformações de menor energia e o RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) da medida de distância da interface de interação entre o receptor e o ligante, gerando no máximo 30 grupos. Após essa primeira etapa, é realizado um refinamento das estruturas que foram selecionadas, passando por uma minimização de energia (KOZAKOV *et al.*, 2017). Após a finalização dessas etapas, o programa retorna as predições das estruturas dos grupos mais populosos das conformações de mais baixa energia. Gráficos moleculares foram plotados usando o pacote UCSF Chimera 1.8 (PETTERSEN *et al.*, 2004).

4.4 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata de três experimentos independentes e os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão. A viabilidade celular foi calculada como uma porcentagem em comparação com a célula não tratada. A CC_{50} (concentração suficiente para metade da efetividade máxima) foi determinada por regressão

não linear com intervalo de confiança de 95%. As comparações estatísticas foram analisadas por ANOVA com pós-teste de Bonferroni utilizando o programa GraphPad Prism[®] versão considerando $p < 0,05$.

5. Resultados

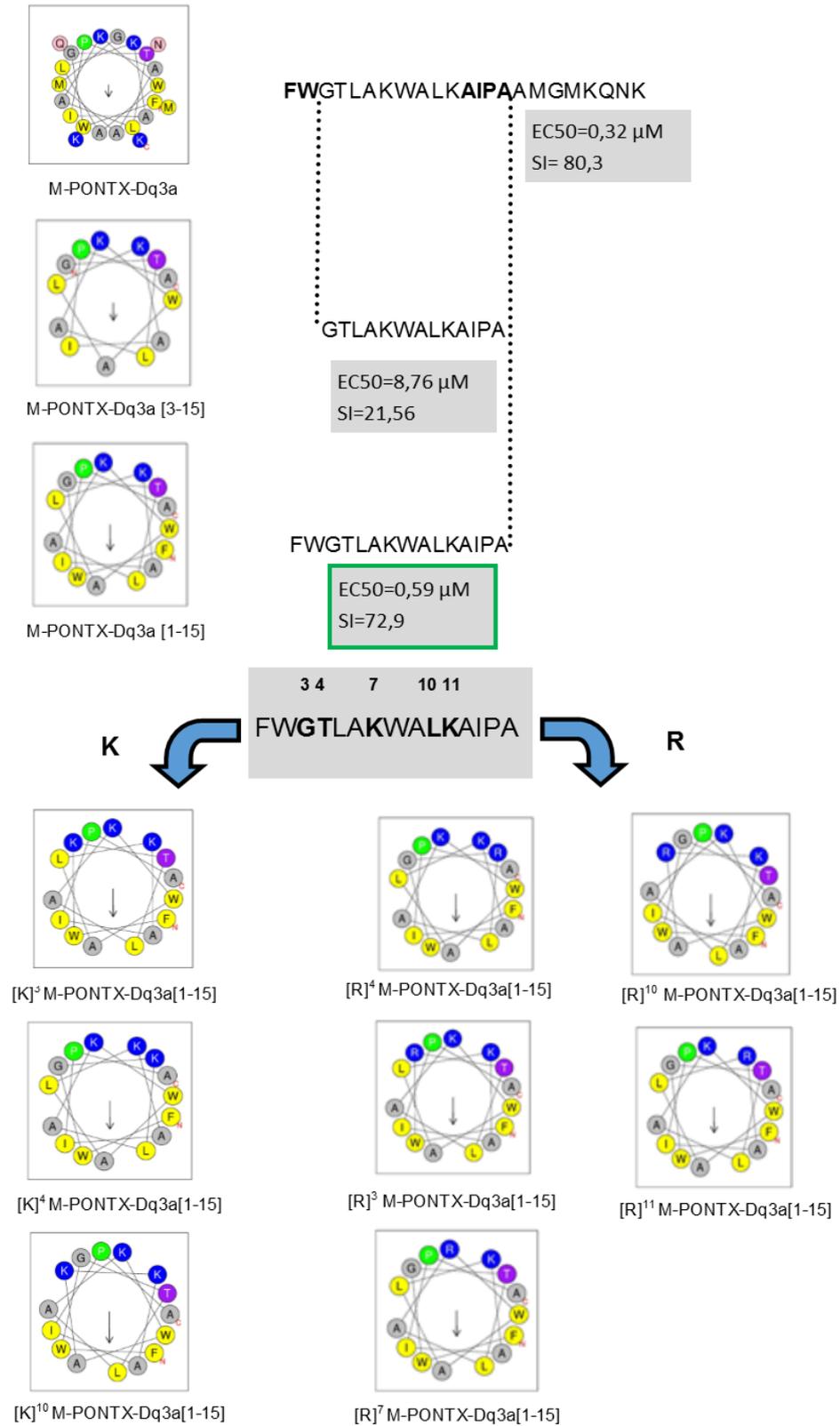
5.Resultados

5.1 Propriedades físico-químicas de fragmentos e análogos do peptídeo de M-PONT Dq3a.

Novos peptídeos foram sugeridos através de análises racionais na busca da região detentora do efeito. Um fragmento N-terminal com 15 aminoácidos (Dq3a[1-15]) e um fragmento N-terminal do terceiro aminoácido até o número 15 (Dq3a[3-15]) foram sugeridos e sintetizados. Esta fragmentação levou a uma redução da carga líquida comparada com a do peptídeo parental em 2 unidades nos 2 fragmentos. A caracterização biofísica desses dois peptídeos mostrou que eles tinham a mesma carga líquida, porém M-PONTX-Dq3a[1-15] teve o maior valor de momento hidrofóbico (μH) e hidrofobicidade (H). Após estudos preliminares do efeito biológico, M-PONTX-Dq3a[1-15] mostrou-se o mais promissor (índice de seletividade >50) e oito análogos de substituições únicas de arginina (Arg) ou lisina (Lys) foram propostas nas posições na face hidrofílica, o que levou ao aumento das cargas líquidas positivas, de +3 para +4 em seis destes peptídeos análogos (Figura 7; Tabela 3).

De acordo com a tabela 3, entre os análogos por substituição por lisina foi observado maior H e μH para a substituição na posição 3 e para os análogos por substituição de arginina foi observada maior H na posição 7 e 10 e maior μH na posição 4. Na figura 16 é possível observar o desenho experimental do presente trabalho

Figura 16. Desenho experimental e projeções da roda helicoidal de dinoponeratoxinas, fragmentos e seus análogos.



Legenda: Círculos amarelos e cinzas indicam aminoácidos hidrofóbicos, azuis, roxos, vermelhos e rosas representam aminoácidos hidrofílico.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a.

Peptídeo	Seqüência	Peso			
		Molecular	Z	H	µH
M-PONTX-Dq3a [1-15]	FWGTLAKWALKAIPA	1673	3	0,782	0,411
M-PONTX-Dq3a [3-15]	GTLAKWALKAIPA	1339,62	3	0,592	0,277
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWKTLAKWALKAIPA	1743,16	4	0,716	0,459
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGKLAKWALKAIPA	1699,10	4	0,699	0,465
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWAKKAIPA	1687,05	4	0,603	0,510
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FW RTLAKWALKAIPA	1772,14	4	0,715	0,460
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGRLAKWALKAIPA	1728,08	4	0,697	0,466
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLARWALKAIPA	1701,02	3	0,781	0,412
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWARKAIPA	1716,03	4	0,601	0,511
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWALRAIPA	1701,02	3	0,781	0,412
M-PONTX-Dq3a (Lima, 2018)	FWGTLAKWALKAIPAAMGMKQNK	2561,13	5	0,509	0,248

FonteElaborada pela autora

Legenda: Z (carga líquida), H (hidrofobicidade), µH (momento hidrofóbico), de acordo com HeliQuest

(<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>).

5.2. Avaliação da citotoxicidade dos fragmentos e análogos derivados M-PONTX-Dq3a em células LLC-MK2.

A citotoxicidade dos peptídeos derivados M-PONTX-Dq3a foi avaliada em células hospedeiras LLC-MK2 após 24 e/ou 48 horas de exposição a diferentes concentrações em μM (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível calcular as EC_{50} dos peptídeos testados, que foi calculada em relação ao controle negativo, cuja absorbância foi considerada 100%. O benznidazol foi utilizado como controle positivo. Estes resultados estão dispostos na **tabela 4**.

Tabela 4. Efeito citotóxico dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a sobre as células LLC-MK2.

Peptídeos	LLC-MK2 (EC_{50})	
	24 h(μM)	48 h(μM)
M-PONTX-Dq3a[3-15]	188,86 \pm 1,77	-
M-PONTX-Dq3a 1-15]	43,05 \pm 0,05	35,78\pm4,12
[Lys]³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	73,4 \pm 0,08	43,85\pm3,5
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	60 \pm 0,07	-
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	97,0 \pm 2,9	-
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	13,03 \pm 1,71	-
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	9,6 \pm 1,2	-
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]	55 \pm 1,2	-
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	25,07 \pm 0,06	-
[Arg] ¹¹ M-PONTX -Dq3a[1-15]	38,5 \pm 1,5	-
Benznidazol	502,6 \pm 57,8	-
M-PONTX-Dq3a (LIMA, 2018)	25,7 \pm 2	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Valores de EC_{50} são expressos em μM . Dados são expressos por média \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes. (-) Significa não realizado.

5.3 Efeito antichagásico de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

A citotoxicidade dos peptídeos derivados M-PONTX-Dq3a foi avaliada em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações em μM (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097). A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%. O benznidazol foi utilizado como controle positivo. As EC_{50} encontradas estão descritas na **tabela 5**.

A partir do valor de EC_{50} obtido de formas tripomastigotas e células LLC-MK2 foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), que representa a seletividade da substância ao parasito em relação à célula de mamífero. Este índice foi calculado pela razão EC_{50} de LLC-MK2/ EC_{50} de tripomastigotas. Os resultados também estão dispostos na **tabela 5**.

Tabela 5. Efeito antichagásico de fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a em formas tripomastigotas da cepa Y *T. cruzi* e índice de seletividade.

Peptídeos	Tripomastigota (EC_{50}) (μM)	IS
M-PONTX-Dq3a [3-15]	8,76 \pm 2,33	21,56
M-PONTX-Dq3a[1-15]	0,59 \pm 0,05	72,9
[Lys]³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	0,86 \pm 0,09	85,3
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	1,03 \pm 1,7	58,2
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	1,09 \pm 1,5	31,5
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	0,69 \pm 0,07	18,8
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	1,09 \pm 0,05	8,8
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]	5,10 \pm 0,8	10,8
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	3,31 \pm 0,09	7,5
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15]	1,54 \pm 0,07	24,7
Benznidazol	161,4 \pm 31,8	3,11
M-PONTX-Dq3a (LIMA, 2018)	0,32 \pm 0,03	80,3

Legenda: Os valores de EC_{50} são expressos em μM . Os dados são expressos como médias \pm SEM de três experimentos independentes. IS= índice de seletividade

5.4 Efeito antichagásico de fragmento e análogo promissores de M-PONTX-Dq3a em formas epimastigota de *T. cruzi*.

Devido aos resultados promissores obtidos ($IS > 50$), a citotoxicidade de M-PONTX-Dq3a[1-15] e $[Lys]^3M$ -PONTX-Dq3a[1-15] foi avaliada em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de exposição a diferentes concentrações em μM (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78). A percentagem de viabilidade celular foi calculada em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%. Para controle positivo foi utilizado o benznidazol. As respectivas EC_{50} encontradas estão dispostas na tabela 6.

Tabela 6. Efeito de M-PONTX-Dq3a [1-15] e M-PONTX- $[Lys]^3$ -Dq3a[1-15] contra a forma epimastigota de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

	M-PONTX- Dq3a [1-15] (μM)	$[Lys]^3M$- PONTX-Dq3a [1-15] (μM)	Benznidazol (μM)	M-PONTX-Dq3a (LIMA, 2018) (μM)
EC₅₀/24h	7,2 \pm 1,4	13,5 \pm 1,5	115,1 \pm 16,3	4,7 \pm 1
EC₅₀/48h	9,7 \pm 0,9	16,8 \pm 0,08	37,4 \pm 5,6	3,6 \pm 0,5
EC₅₀/72h	8,7 \pm 0,6	19,3 \pm 0,06	22,1 \pm 2,9	2,4 \pm 0,4

Legenda: Os valores de EC_{50} são expressos em μM . Os dados são expressos como médias \pm SEM de três experimentos independentes.

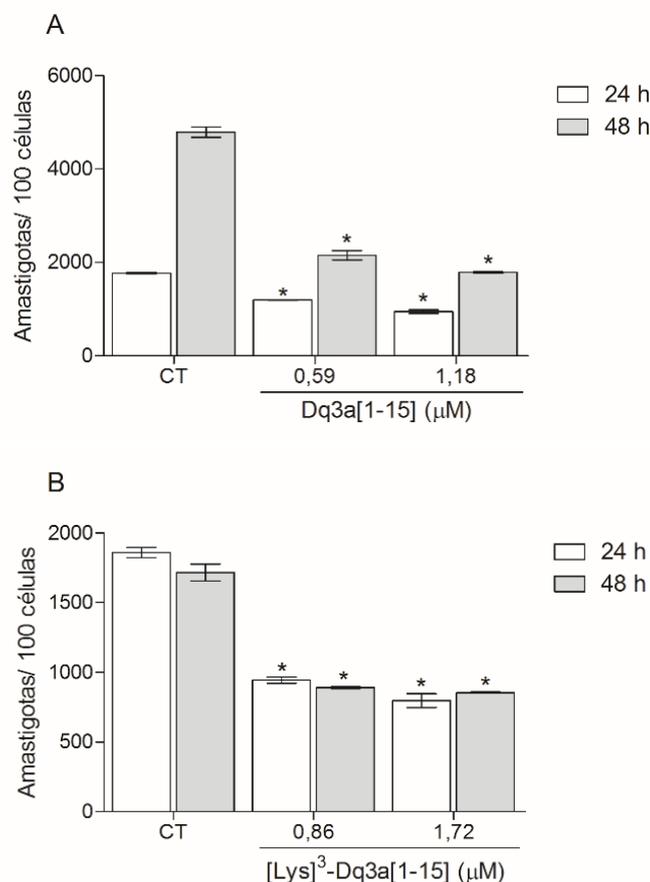
M-PONTX-Dq3a [1-15] demonstrou a menor EC_{50} em 24 horas e não demonstrou uma alteração significativa entre os tempos de 48 e 72 horas. $[Lys]^3M$ -PONTX-Dq3a[1-15] demonstrou diferenças significativas entre as EC_{50} dos 3 tempos, sendo a EC_{50} de 24 horas a menor encontrada. O controle positivo benznidazol mostrou EC_{50} s maiores do que de M-PONTX-Dq3a[1-15] e $[Lys]^3M$ -PONTX-Dq3a[1-15] nos 3 tempos de incubação, sendo maior, no período de 24 horas, em 15 e 8 vezes respectivamente.

5.5 Efeito antichagásico de fragmento e análogo promissores de M-PONTX-Dq3a na forma amastigota de *T. cruzi*

Os peptídeos promissores M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]³M-PONTX-Dq3a[1-15] foram testados em ensaios de formas amastigotas. Foram realizados ensaios em 24h e 48h, utilizando a EC₅₀ e dobro da EC₅₀ das formas tripomastigotas. O parâmetro avaliado foi o número de amastigotas por 100 células.

Ambos peptídeos testados demonstraram diminuição no número de amastigotas/100 células nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 17). Ambos também mostraram valores de EC₅₀ menores nos tempos de 48 h e índices de seletividades maiores nos tempos de 48 h (Tabela 7).

Figura 17. Efeito de M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma amastigota intracelular de cepa Y de *T. cruzi*.



Legenda: Contagem de amastigotas/100 células tratadas com M-PONTX-Dq3a [1-15] (A) e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] (B). Dados correspondentes a contagem de 300 células em 24 e 48 horas de incubação em três experimentos independentes (CT: controle em PBS).

Tabela 7. Efeito de M-PONTX-Dq3a e [Lys]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] contra formas amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e índice de seletividade.

	Amastigotas EC ₅₀ /24h	IS/24h	Amastigotas EC ₅₀ /48h	IS/48h
M-PONTX-Dq3a[1-15]	1,32±0,38	32,61	0,37±0,17	96,7
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	0,91±0,2	80,65	0,28±0,15	156,6

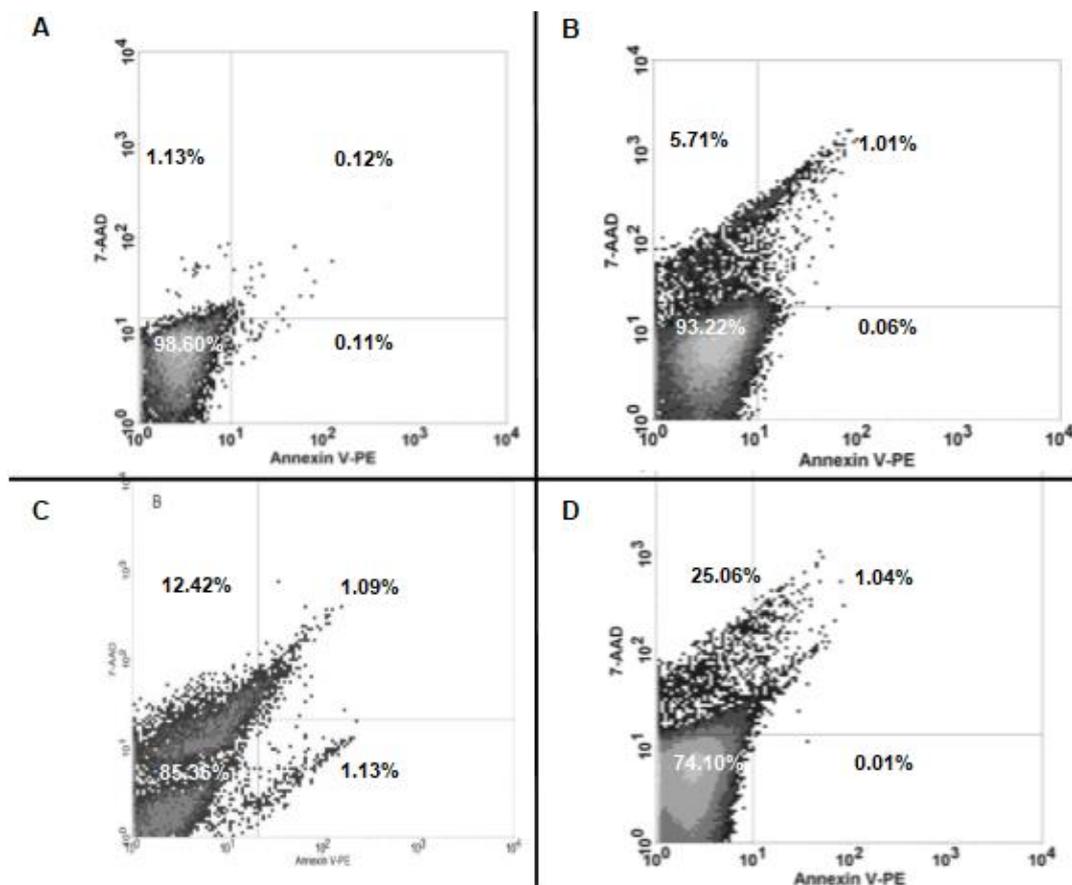
Os valores de EC₅₀ são expressos em µM. Os dados são expressos como médias ± SEM de três experimentos independentes. IS= índice de seletividade.

5.6 Avaliação do perfil de Morte.

Para avaliar o perfil de morte celular, formas epimastigota dos parasitos foram tratados com as respectivas EC₅₀ dos peptídeos M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] e marcados com 7AAD (marcador de necrose celular que entra na célula através de uma lesão na membrana plasmática) e Anexina-V (AX) (marcador de apoptose pela externalização de fosfatidilserina).

Nesse ensaio, foi observado aumento do percentual de células marcadas por 7AAD para 12,42% com o tratamento com M-PONTX-Dq3a [1-15] e para 25,06% com o tratamento com M-PONTX- [Lys]³-Dq3a[1-15], indicando morte celular por necrose. O tratamento com benznidazol na EC₅₀ também aumentou a marcação para 5,71% (**Figura 18**).

Figura 18. Avaliação por citometria de fluxo da morte celular de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: A) Formas epimastigotas não tratadas, (B) tratadas com benznidazol 125 μM , (C) tratadas com Dq3a[1-15] a 7,2 μM e (D) [Lys]³-Dq3a[1-15] a 13,5 μM durante 24 h marcado com anexina V conjugada com ficoeritrina (Anexina V-PE) e/ou 7-AAD (7-aminoactinomicina D). Os valores percentuais são médias de 10.000 eventos de três experimentos independentes.

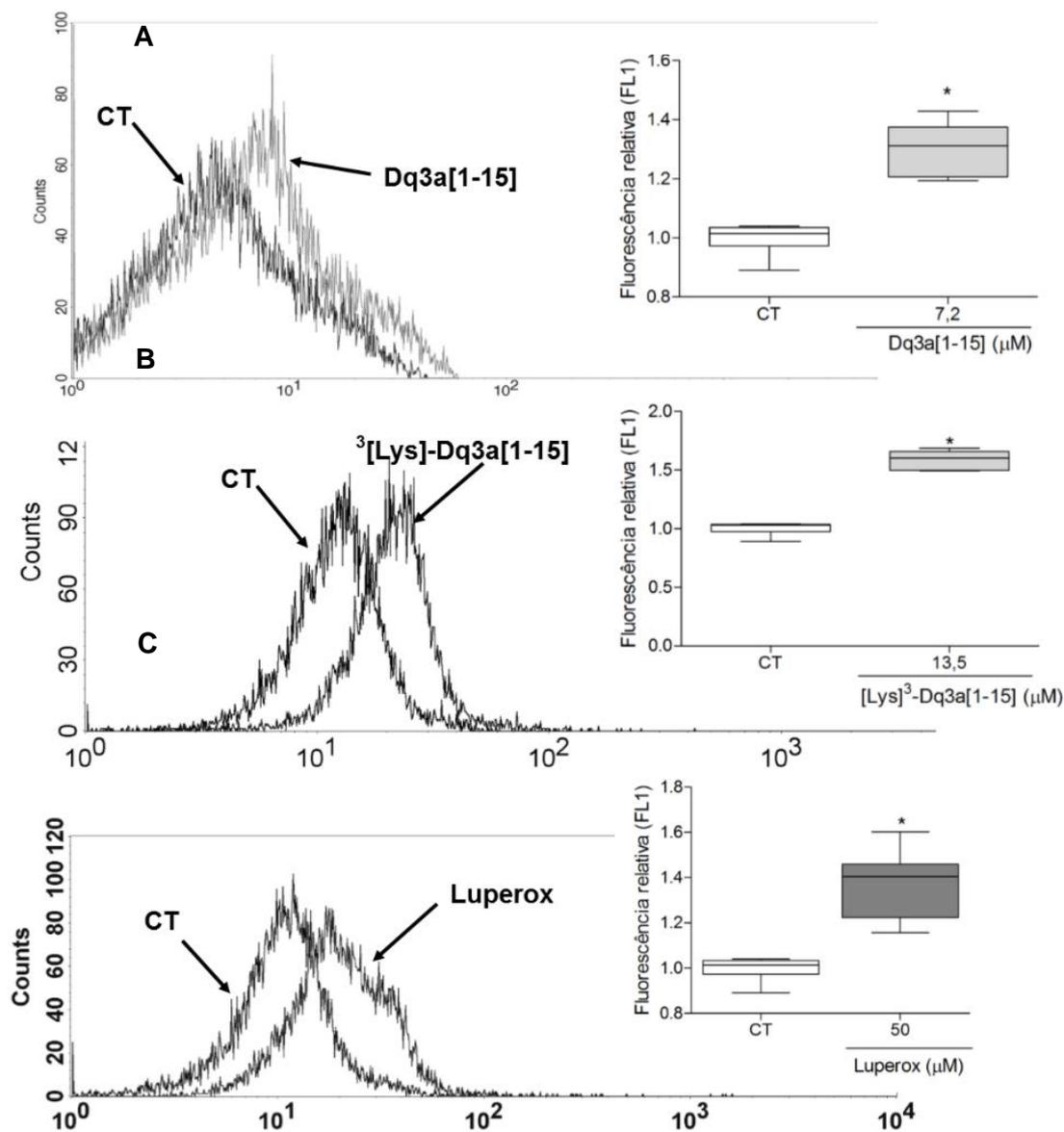
5.7 Mensuração da liberação de espécies reativas de oxigênio.

Com o intuito de investigar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no processo de morte celular, formas epimastigotas foram marcadas com 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), que é permeável à membrana celular e não-fluorescente. Na presença de EROs, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (SRIVASTAVA et al., 2009).

A análise da produção de EROs induzida pelo tratamento M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] foi analisada após 24 horas de incubação com formas epimastigotas concentrações de 7,2 μM e 13,5 μM respectivamente. Foi

observado aumento em torno de 50% de espécies reativas oxigênio em ambos os peptídeos, bem como no controle positivo luperox (50 μM), radical iniciador para indução de polimerização de radicais livres (**figura 19**).

Figura 19. Análise de citometria de fluxo da formação de EROS em formas epimastigotas tratadas com M-PONTX-Dq3a[1-15] e $[\text{Lys}]^3$ -M-PONTX-Dq3a[1-15].

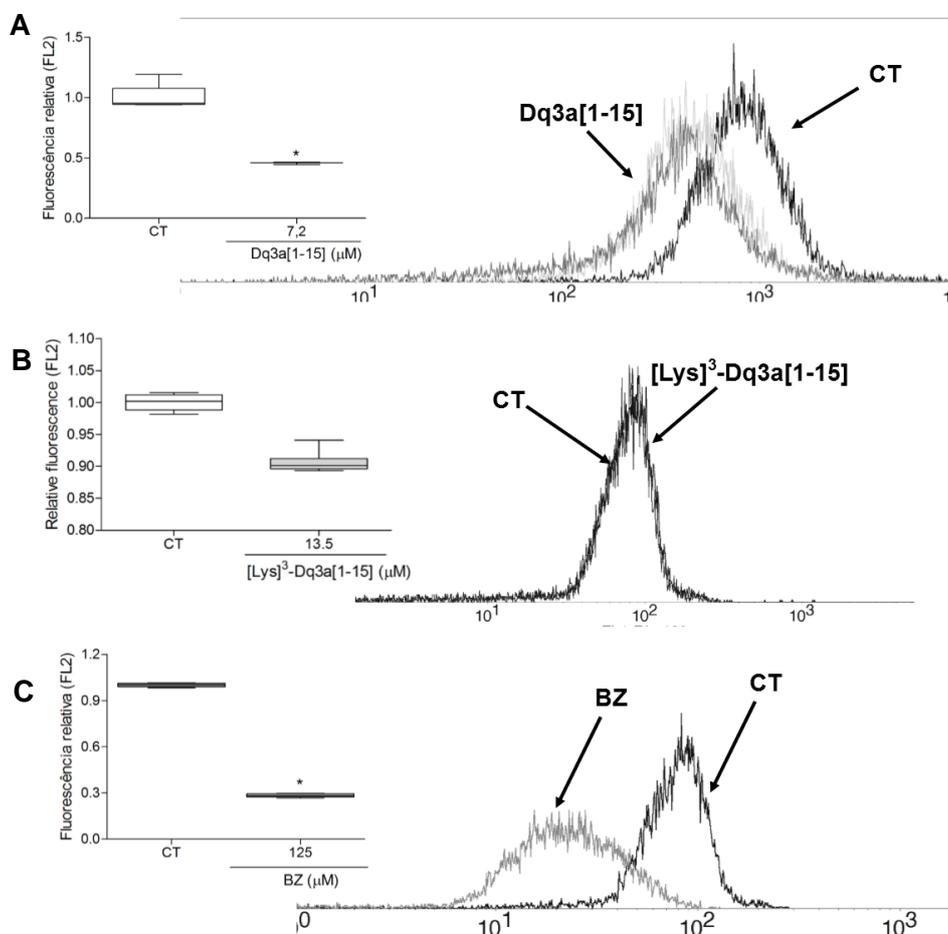


Legenda: Análise de citometria de fluxo da formação de EROS em formas epimastigotas tratadas com Dq3a[1-15] a 7,2 μM (A) e $[\text{Lys}]^3$ -Dq3a[1-15] a 13,5 μM (B) e Luperox 50 μM (C). CT= controle negativo.

5.8 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Nesse ensaio, o parasito na sua forma epimastigota tratada com Dq3a[1-15] (7,22 μM) e [Lys]³-Dq3a[1-15] (13,5 μM) foi incubado por 24 h e marcado com rodamina 123 (Rho 123). Rho 123 é um marcador fluorescente específico que se acumula no espaço intermembrana mitocondrial de células viáveis. Dano no potencial transmembrânico mitocondrial causa redução do acúmulo de Rho123. A figura 20 mostra diminuição no potencial transmembrânico mitocondrial após o tratamento com Dq3a[1-15] em torno de 50% e no controle positivo benznidazol em torno de 70%, enquanto que o tratamento com [Lys]³-Dq3a[1-15] não mostrou efeito no potencial transmembrânico mitocondrial.

Figura 20. Análise de citometria de fluxo no potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas tratadas com Dq3a [1-15] e [Lys]³-Dq3a[1-15].

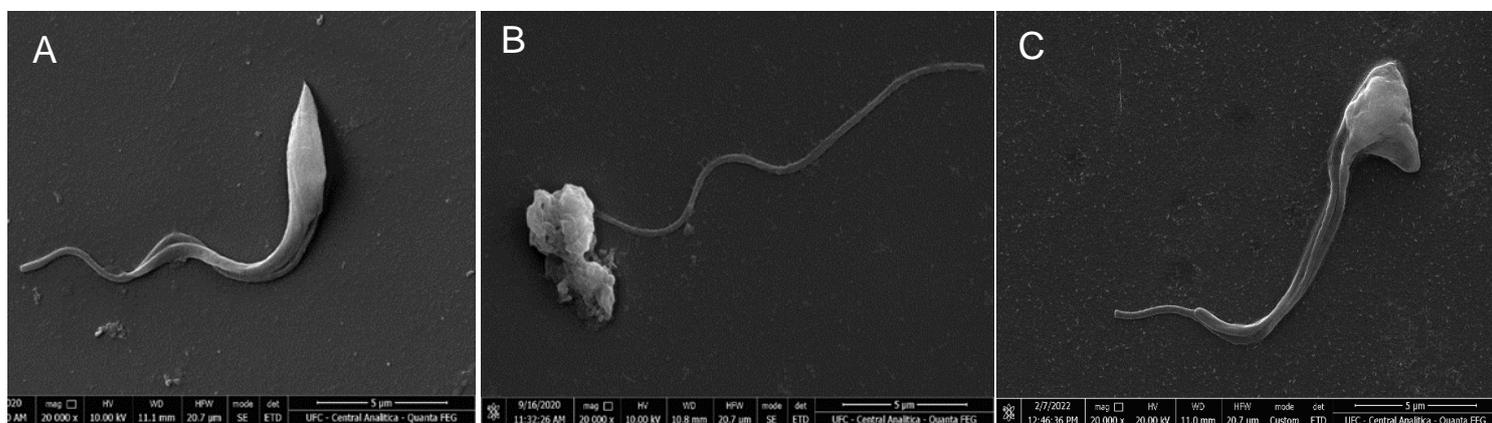


Legenda: Análise de citometria de fluxo no potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas tratadas com Dq3a[1-15] a 7,2 μM (A) e [Lys]³-Dq3a[1-15] a 13,5 μM (B) e benznidazol 125 μM (C). CT= controle negativo, BZ= benznidazol.

5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As análises por microscopia eletrônica de varredura em formas epimastigotas não tratadas e tratadas Dq3a[1-15] e [Lys]³-Dq3a[1-15] durante 12h de incubação nas concentrações de EC₅₀ evidenciaram alterações morfológicas provocados por estes ao parasito, confirmando envolvimento de processo de necrose no mecanismo de morte do *T. cruzi*. A figura 21 mostra que o grupo controle não tratado apresenta parasitos intactos com membranas bem preservadas. Os parasitos tratados com Dq3a[1-15] (Figura 21B) apresentam alterações visíveis com extravasamento do conteúdo celular e parasitos tratados com [Lys]³-Dq3a[1-15] mostram degradação de membrana (Figura 21C), ambos caracterizando necrose.

Figura 21. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 12 h de incubação com Dq3a[1-15] e [Lys]³-Dq3a[1-15].



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Epimastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. (A) Controle negativo, onde observam-se parasitos com comprimento adequado, corpos alongados típicos e intactos morfológicamente, (B) extravasamento de material celular nos parasitos tratados com Dq3a[1-15] e (C) degradação de membrana nos parasitos tratados com [Lys]³-Dq3a[1-15]. Barra de escala: 5 µm.

5.10 Docking Molecular.

Foram realizadas simulações de interações dos peptídeos com as enzimas cruzaina, tripanotiona redutase e TcGAPDH, bem como com inibidores conhecidos de

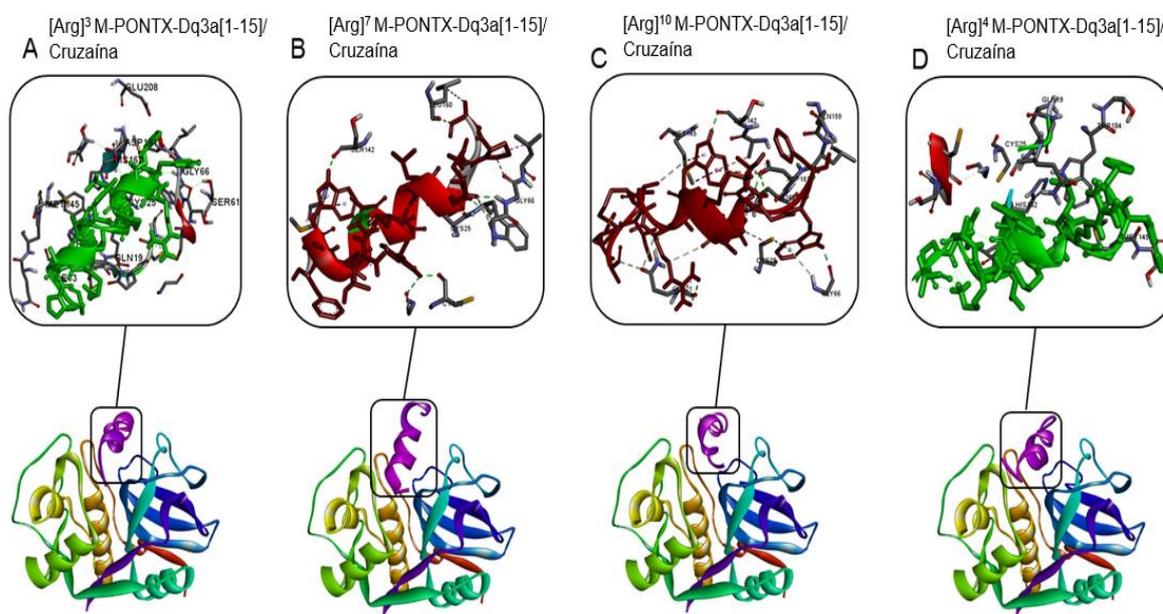
cada enzima, tetrafluorofenoximetil cetona (KB2), quinacrina mostarda (QUM) e chalepina, respectivamente.

Após as simulações com a cruzaína, os peptídeos substituídos com arginina que acoplaram próximo a região do inibidor KB2 e que apresentaram melhor resultado de interação (Tabela 8) foram [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] (**Figura 22**).

Tabela 8. Modelos resultantes do docking molecular entre os peptídeos e a enzima cruzaína.

Complexo	Tamanho do <i>Cluster</i>	Modelo de pontuação	Pontuação ponderada
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Cruzaína	286	vdW	-1412.0
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Cruzaína	377	vdW	-1184.7
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Cruzaína	469	vdW	-881.9
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Cruzaína	257	vdW	-864.3

Figura 22. Complexos de cruzaina com [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] (A), [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15] (B), [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] (C), [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15](D).

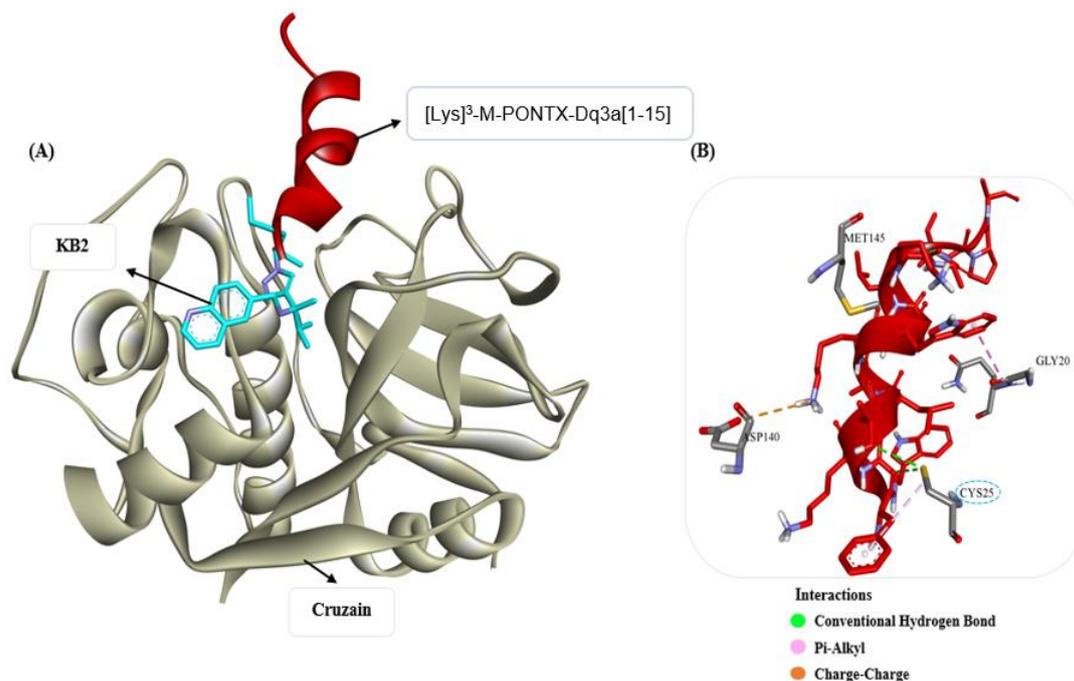


Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Peptídeos em lilás.

Dos peptídeos substituídos por lisina, [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] acoplou na região do inibidor co-cristalizado KB2 (**Figura 23A**), apresentando como interações mais significativas, duas ligações de hidrogênio (3.56 Å e 3.77 Å) e uma interação pi-alkyl (5.26 Å) com o resíduo Cys25 (**Figura 23B**) da tríade catalítica da cruzaina (Asn175, Cys25, His159). O complexo também apresentou duas interações do tipo alkyl com o resíduo Met145 (4.67 Å e 4.90 Å), uma interação pi-stacked com o Gly20 (4.03 Å) e uma interação charge-charge com o Asp140 (5.25 Å).

Figura 23. Complexo de interação entre a enzima cruzaina e os ligantes [Lys]3-M-PONTX-Dq3a[1-15] e KB2 (A). Sítio de interação do ligante [Lys]3-M-PONTX-Dq3a[1-15] com o alvo (B).



Fonte: Elaborada pela autora

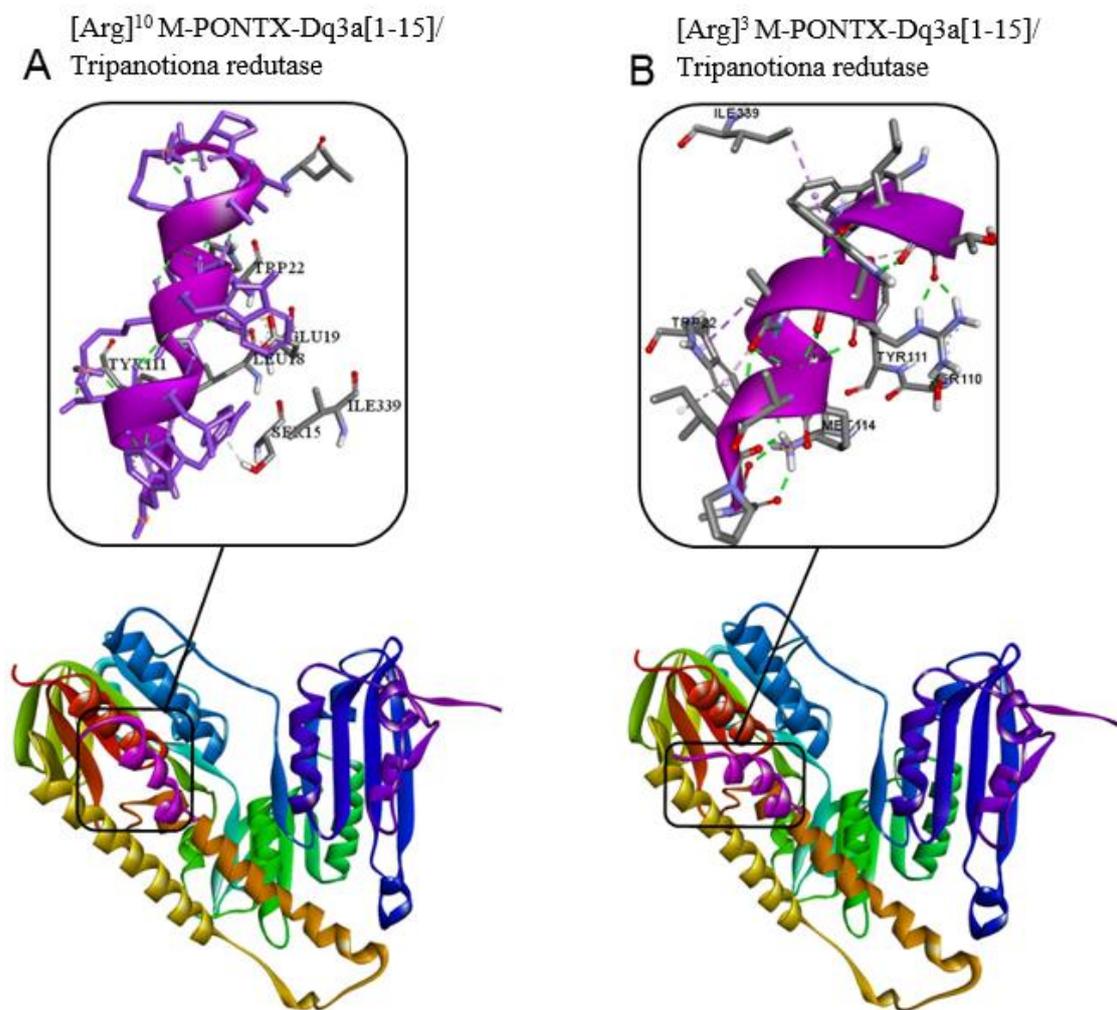
Legenda: Peptídeo em vermelho

Após as simulações com a Tripanotona redutase, os peptídeos que acoplaram na região do inibidor QUM e que apresentaram melhor resultado de interação (Tabela 9) foram [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] (**Figura 24**).

Tabela 9. Modelos resultantes do docking entre os peptídeos e a enzima Tripanotona redutase.

Complexo	Tamanho do Cluster	Modelo de pontuação	Pontuação ponderada
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Cruzaina	458	vdW	-987.0
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Cruzaina	185	vdW	-1159.5

Figura 24. Complexos de interação entre a enzima Tripanotona redutase e os ligantes [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Tripanotona redutase (A) e [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15]/ Tripanotona redutase.

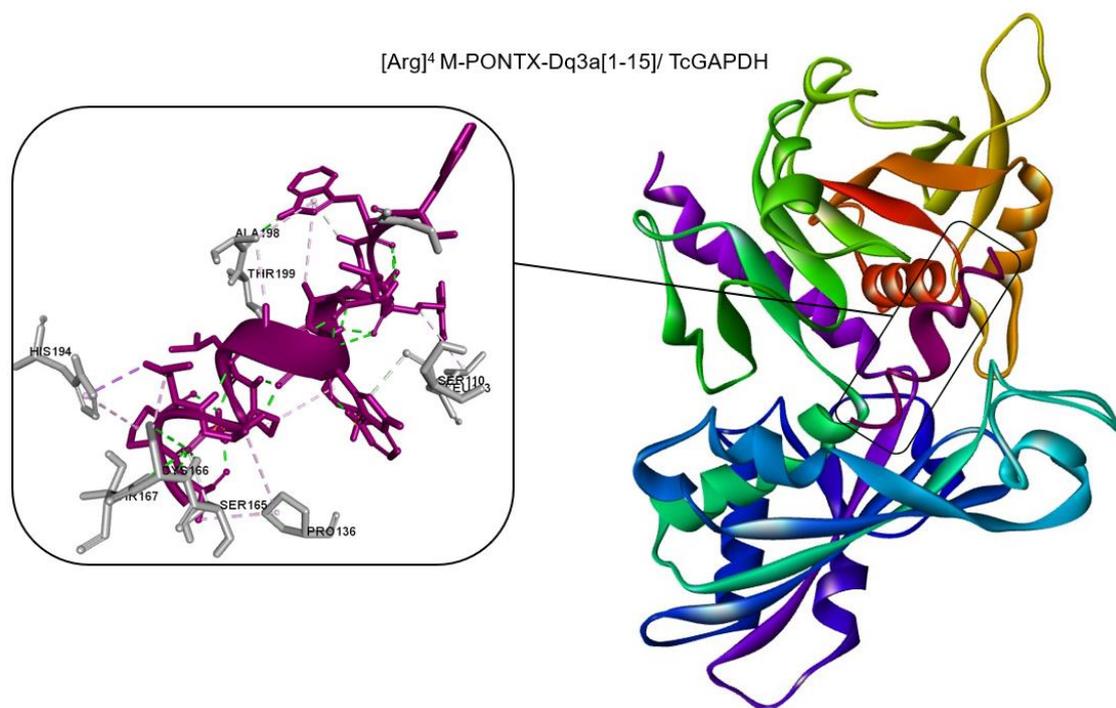


Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Peptídeos em lilás.

Após as simulações com a TcGAPDH, o peptídeo que acoplou na região do inibidor chalepina (cadeia C) e que apresentou melhor resultado de interação, foi o peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]. Os demais peptídeos interagiram com a TcGAPDH, mas com menor força de interação e com acoplamento em regiões diferentes do sítio catalítico (**figura 25**).

Figura 25. Complexo TcGAPDH/ [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15].



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Peptídeos em lilás.

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença milenar e mesmo assim continua sendo responsável por um grande impacto social e econômico em países em todos os continentes, assim é notável a necessidade pela busca de novas opções terapêuticas para seu tratamento. Apesar dos grandes avanços na pesquisa e descoberta de novos medicamentos, a DC continua sem um tratamento eficaz. O benznidazol atualmente é utilizado como padrão ouro no seu tratamento, mesmo tendo sido descoberto há mais de cinquenta anos e não sendo efetivo na fase crônica na doença (Urbina and Docampo, 2003). Além disso, benznidazol possui uma alta toxicidade e cepas resistentes existem a anos, assim como a cepa Y de *T. cruzi*, utilizada neste trabalho.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são considerados moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de DC devido a seu amplo espectro de ação, baixa toxicidade e baixo desenvolvimento de resistência pelos parasitos. Devido sua carga positiva, eles podem ser atraídos para as membranas negativamente carregadas dos parasitos (Deslouches and Di, 2017; McGwire and Kulkarni, 2010). No entanto, os PAMs naturais apresentam algumas limitações, como falta de estabilidade *in vivo*, toxicidade e tamanho grande (> 20 aa.), que aumentam os custos de produção.

Recentemente, demonstramos que o veneno total da *Dinoponera quadriceps* possuía efeito tripanocida com alto índice de seletividade (IS) (LIMA *et al.*, 2016) e identificamos no transcriptoma da glândula de veneno, as dinoponeratoxinas (DNTXs) como componente majoritário (Torres *et al.*, 2014). O efeito do veneno total contra *Trypanosoma cruzi* foi parcialmente atribuído a 2 destas DNTXs (M-PONTX-Dq3a e M-PONTX-Dq-3348) e uma delas (M-PONTX-Dq3a) se enquadrou dentro dos critérios estabelecidos pela OMS para um candidato antichagásico ser considerado um sucesso ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$; $IS > 50$) (LIMA *et al.*, 2018; NWAKA; HUDSON, 2006).

Dada à necessidade de desenvolvimento de novas terapêuticas antichagásicas eficazes e menos tóxicas, as DNTXs mostram grande potencial como modelos estruturais; entretanto são necessárias modificações moleculares para melhorar a seletividade e/ou diminuir a toxicidade destas moléculas (Drin and Antony, 2010), buscando assim, uma estrutura ideal.

M-PONTX-Dq3a (23aa) apresentou a maior potência (EC_{50} de $0,32 \mu\text{M}$ em tripomastigotas) e índice de seletividade (80). Esse peptídeo é clivado naturalmente (na glândula de veneno) em dois fragmentos N-terminais M-PONTX-Dq3b e M-

PONTX-Dq3c, que possuem 13 e 11 aminoácidos, respectivamente. M-PONTX-Dq3c demonstrou uma baixa ação tripanocida em formas tripomastigotas ($EC_{50}= 34,8 \mu M$) e nenhum efeito sobre formas epimastigotas nas concentrações testadas. M-PONTX-Dq3b demonstrou baixo efeito tripanocida sobre formas epimastigotas ($EC_{50}/24h= 48,8 \mu M$) e em tripomastigotas ($EC_{50}= 7,4 \mu M$), porém melhor que M-PONTX-Dq3c. Assim surgiu a dúvida se o pedaço complementar a M-PONTX-Dq3c poderia ser o responsável pelo efeito do peptídeo completo. Este pedaço C-terminal foi sintetizado e nomeado M-PONTX-Dq3a[12-23], mas não demonstrou nenhum efeito em formas tripomastigota e epimastigotas (LIMA, 2018).

Assim, foi sugerido o desenho de dois fragmentos não naturais derivados do peptídeo parental para identificar a menor sequência com melhor efeito antiparasitário, um até a posição do aminoácido 15, M-PONTX-Dq3a [1-15] e outro do aminoácido 3 ao 15, M-PONTX-Dq3a [3-15].

Estes fragmentos foram testados contra *T. cruzi*, M-PONTX-Dq3a[1-15] apresentou atividade antiparasitária semelhante ao peptídeo parental ($EC_{50}=0,59 \mu M$; $IS=72,9$), com as vantagens de uma menor sequência de aminoácidos e menor toxicidade, facilitando sua síntese e barateando o processo. Já o M-PONTX-Dq3a[3-15] apresentou $EC_{50}=8,76 \mu M$ e $IS=21,56$, não se encaixando nos critérios exigidos pela OMS.

Crotalicidina (Ctn), peptídeo tripanocida com alto IS com 34 aminoácidos também foi previamente fragmentado para 14 aminoácidos em Cnt[1-14] e 20 aminoácidos em Cnt[15-34], porém estes fragmentos não se mantiveram dentro dos critérios da OMS como promissores (BANDEIRA, 2017). M-PONTX-Dq3a[1-15], com a redução da molécula de 23 aminoácidos para 15 em relação ao peptídeo parental foi observado que este se manteve de acordo com as características exigidas pela OMS para ser considerado uma molécula promissora no combate de DC, apesar de ter ocorrido a diminuição do índice de seletividade. Então, foram realizadas mudanças na sequência de aminoácidos desse fragmento com o objetivo de retornar ou ultrapassar o IS do peptídeo parental.

As estratégias de projeto incluíram substituições de resíduos polares não carregados por arginina ou lisina (resíduos polares carregados) para aumentar a seletividade aos fosfolipídios carregados negativamente presentes nas membranas dos microrganismos (LOHNER, 2017). Com base nos resultados anteriores, decidimos não

fazer nenhuma alteração na sequência Dq3a[11-15] e nos dois primeiros aminoácidos Dq3a[1-2], que parecem ser importantes para o efeito biológico. Portanto, alteramos as posições hidrofílicas 3, 4, 7, 10 e 11, gerando cinco análogos substituídos por Arg e três análogos substituídos por Lys.

Em um estudo recente conduzido por nosso grupo de pesquisa, substituições de Arg foram capazes de aumentar a seletividade na cepa Y de *T. cruzi* (PEDRON, 2020), mas na presente investigação, um peptídeo substituído por Lys apresentou o maior efeito e IS ([Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15]. Na posição de substituição 3, Lys e Arg apresentaram quase os mesmos parâmetros físico-químicos, porém mostraram grandes diferenças quanto aos seus efeitos biológicos. O análogo substituído por [Arg]³ apresentou uma toxicidade 5,6 vezes superior e uma seletividade inferior ao análogo substituído por [Lys]³.

Dentre os análogos obtidos por substituição de Lys obtivemos dois peptídeos com IS superior a 50, com as substituições nas posições 3 e 4, [Lys]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] (IS=85,3) e [Lys]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] (IS=58,2). Devido aos maiores valores de IS, consideramos M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]³- M-PONTX-Dq3a[1-15], como os melhores candidatos a se tornarem potenciais alternativas antiparasitárias.

As atuais alternativas antiparasitárias, nifurtimox e benznidazol, são eficazes em apenas 20% dos casos crônicos, por consequência de sua baixa penetrabilidade nas células e, portanto, da incapacidade de atingir a forma amastigota, que é a responsável pela manutenção da infecção (MORILLA, 2015). Na presente investigação, demonstramos que tanto M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]³-Dq3a[1-15] são capazes de diminuir o número de formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (cepa resistente ao benznidazol) em culturas celulares, onde é observada uma menor quantidade de amastigota por célula na infecção tratada pelo análogo substituído por lisina. Além disso, nossos resultados indicam que [Lys]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] tem uma potência contra as formas tripomastigotas 187 vezes maior que o benznidazol e seletividade parasitária 28 vezes maior também.

Mecanismos de morte celular de autofagia, morte celular semelhante a apoptose e necrose foram encontrados em tripanossomatídeos patogênicos. O mecanismo de apoptose ainda não foi elucidado completamente e a participação de metacaspases e modulação pela presença de reguladores apoptóticos da família Bcl-2

continua incerto. A via necrótica é evidenciada pela intensa vacuolização citosólica, forte efeito sobre a mitocôndria, fragmentação aleatória do DNA e ruptura da membrana plasmática (MENNA-BARRETO, 2019). Na presente investigação, o mecanismo de ação dos novos peptídeos foi avaliado em formas epimastigotas por citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Pela técnica de citometria de fluxo foi observado a marcação predominante por 7AAD+/AX- em ambos os peptídeos testados caracterizando um processo de morte celular necrótico, o qual está relacionado a perda de integridade de membrana e que pode estar associado a dano de organelas, comprometendo drasticamente a recuperação dos parasitos (MENNABARRETO, 2019)

Também foi observado aumento da produção de espécies reativas de oxigênio para ambos os peptídeos testados, podendo está relacionado com a inibição ou desestabilização por ligação em sítios alostéricos da enzima tripanotiona redutase que é um dos mediadores antioxidantes mais importantes para sobrevivência do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro vertebrado, influenciando assim diretamente na sobrevivência, proliferação e virulência do microrganismo (PIACENZA; TRUJILLO; RADI, 2019). Assim, enzimas antioxidantes como a tripanotiona reductase (TcTR) são essenciais para a sobrevivência do parasito (BOMBAÇA et al., 2019).

Entretanto, apenas M-PONTX-Dq3a[1-15] foi capaz de reduzir o potencial transmembrânico mitocondrial em 24 horas de incubação o que pode ser correlacionando pela produção de espécies reativas de oxigênio observado pelo tratamento com esse peptídeo, uma vez que a manutenção da função mitocondrial é importante no balanço redox em tripanossomatídeos e na produção e neutralização de EROs.

Outro papel importante da mitocôndria é a produção de energia celular por meio da criação de moléculas de ATP, energia essa necessária para diversas funções vitais do parasito como por exemplo o processo de metociclogênese, transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, processo no qual também é de suma importância a ação da enzima cruzaina participando da adesão entre o parasito e o intestino do barbeiro, no hospedeiro invertebrado (BATISTA et al., 2015; i (LOSINNO et al., 2021; SAN FRANCISCO et al., 2017).

A cationicidade (carga líquida positiva) é uma importante característica físico-química dos peptídeos, que influencia as interações peptídeo-membrana

modulando as interações eletrostáticas iniciais entre os PAMs e os fosfolipídios carregados negativamente presentes nas membranas do microrganismo (PEDRON et al., 2019). O análogo substituído por lisina [Lys]³M-PONTX-Dq3a[1-15] tem uma carga líquida positiva maior em 1 ponto do que M-PONTX-Dq3a[1-15]. Essa mudança não só aumentou a seletividade do peptídeo, mas é provavelmente responsável pela maior afinidade para interação com a membrana de *T. cruzi*. Além disso, as diferenças na interação da membrana mitocondrial observadas apenas para M-PONTX-Dq3a[1-15] também podem ser explicadas pela maior afinidade de ligação do análogo substituído por lisina à membrana externa.

O dano causado pelos peptídeos à membrana do *T. cruzi* foi confirmada pela técnica MEV onde foi observado alteração em seu formato típico e extravasamento celular, corroborando com o processo de necrose como principal mecanismo de ação para ambos os peptídeos.

PAMs de outros venenos animais, como a batroxidina (MELLO et al., 2017) e crotalicidina (BANDEIRA et al., 2018) também são capazes de induzir necrose com alto IS. No entanto, benznidazol que também induz necrose, possui um baixo IS.

Além disso, uma qualidade única de muitos PAMs são seus múltiplos mecanismos de ação, que juntos contribuem para sua atividade tripanocida geral. Sua atividade antiprotozoaria pode ser direta, rompendo membranas ou mirando alvos internos, incluindo DNA, RNA e síntese de proteínas, bicamadas lisossômicas, organelas relacionadas com o armazenamento de cálcio, mitocôndrias ou interrompendo atividades enzimáticas chave (Sabiá Júnior et al., 2019).

A investigação bioquímica comparativa entre o parasito e o hospedeiro, no intuito de descobrir rotas metabólicas diferenciadas, que sejam alvo para uma inibição seletiva, bem como para elucidação do modo de interação do composto com seu alvo. Estudos recentes identificaram potenciais alvos quimioterápicos em tripanossomatídeos, que incluem as enzimas GADPH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), cruzafina e o sistema tripanotiona/tripanotiona redutase (SOEIRO; CASTRO, 2008; SOUZA, 2014).

Assim foram realizadas simulações de interações dos peptídeos com as enzimas cruzafina, tripanotiona redutase e TcGAPDH, bem como com inibidores conhecidos de cada enzima, tetrafluorofenoximetil cetona (KB2), quinacrina mostarda (QUM) e chalepina.

Os fragmentos M-PONTX-Dq3a[1-15] e M-PONTX-Dq3a[3-15] não mostraram interação com os alvos estudados com nenhuma das enzimas estudadas, porém não podemos descartar a possibilidade de interações em sítios alóstericos e possível desestabilização enzimática. Os peptídeos substituídos com arginina [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] mostraram interação com tripanotona redutase, [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] com a TcGAPDH e [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] mostraram interação com cruzaina. Entretanto, a seletividade destes peptídeos mostrou seletividade entre 7,5 e 18,8, muito baixa para ser considerado promissor pela OMS (Nwaka and Hudson, 2006).

Dos peptídeos substituídos por lisina, [Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15] mostrou interação com a enzima cruzaina, diferente do M-PONTX-Dq3a[1-15]. Essa interação pode ser a responsável pelo menor número de amastigota por célula durante a infecção realizada, uma vez que a cruzaina quando inibida irá dificultar a transformação da forma tripomastigota em amastigota. A ação da inibição da cruzaina somada com o aumento da carga positiva que o torna mais atraente à membrana do parasito podem ser os responsáveis pelo aumento da seletividade promovido pela substituição por lisina, e pela maior produção de espécies reativas de oxigênio além do melhor efeito sob as formas amastigotas. O bloqueio desta enzima é associado com uma interferência na metacicloênese, nutrição, redução da infectividade, inibição da proliferação e, conseqüentemente, morte do parasito, principalmente nas formas tripomastigotas e amastigotas (BATISTA et al., 2015; LOSINNO et al., 2021).

Ao todo, projetamos racionalmente dois novos peptídeos derivados de M-PONTX-Dq3a que apresentam vantagens a atividade antichagásica sobre o medicamento padrão, enquanto aumentam as oportunidades destes peptídeos para atingir ensaios clínicos.

7. CONCLUSÃO

Dentre os dez fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a testados, três deles obtiveram IS superior a 50, sendo um fragmento (M-PONTX-Dq3a[1-15]) e dois análogos ([Lys]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15]) evidenciando que a importância dos aminoácidos iniciais da sequência peptídica para o efeito tripanocida, além disso também é observado que os análogos substituídos com lisina tiveram melhor atividade tripanocida do que aqueles sintetizados com arginina.

A fragmentação em M-PONTX-Dq3a[1-15] e a substituição por lisina na posição 3 foram capazes de otimizar e gerar o peptídeo com melhor atividade tripanocida, sendo obtido uma redução da toxicidade, aumento da seletividade, bem como a redução do tamanho da molécula e o custo e tempo de produção da mesma.

8. REFERÊNCIAS

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEUCLER, N.; TORRICO, F.; HIBBERT, D. A tribute to Cecilio Romaña: Romaña's sign in Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**. Vol. 14(11): e0008836, 2020.
- BOCCHI, E.A, BESTESSI, R.B, SCANAVACCA, MI, et al. Chronic chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. **J Am Coll Cardiol** vol. 70(12):1510–24. 28, 2017.
- BOPARAI, J.K; SHARMA, P.K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein Pept Lett**. Vol 27 (1): 4-16, 2020.
- CARLIER, Y, TORRICO, F, SOSA-ESTANI, S, et al. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **PLoS Negl Trop Dis**. VOL 5(10):e1250, 2011.
- CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Comput Struct Biotechnol**, vol 15:98-103, 2017.
- CHELESKI, J. et al. Expression, purification and kinetic characterization of Histagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein Expression and Purification*, v. 76, n. 2, p. 190–196, 2011.
- COMEAU, Stephen R. *et al*. ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 2004.
- DOYLE, P. S. et al. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS pathogens*, v. 7, n. 9, p. e1002139, set. 2011.
- DNDI (2018). Chagas Fact sheet. Disponível em https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/08/Factsheet_2019_Chagas.pdf 2018.
- ECHEVERRIA, L.E.; MORILLO, C.A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infect Dis Clin N Am** . VOL. 33: 119–134, 2019.
- ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1987.
- GAMBOA, R.S.; LÓPEZ-GÁRCIA, L.; MORENO-SÁNCHEZ, F. *Trypanosoma cruzi* infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas Disease. **Parasit Vectors**. Vol. 12: 506, 2019.
- FRY, D.E. Antimicrobial Peptides. **Surg Infect**. Vol 19 (8): 804-811, 2018.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Z. et al. Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox biology*, v. 26, p. 101231, 2019.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**. Vol 36(3):164-169, 2019.

HAFEEZ, A.B.; JIANG, X.; BERGEN, P.J.; ZHU, Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. **Int J Mol Sci**. Vol 22(21): 11691, 2021

KOZAKOV, Dima *et al.* PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 2006.

KOZAKOV, Dima *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 2017.

KRATZ, J.M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta Trop**. Vol 198: 105107, 2019.

KRATZ, J.M, BOURNISSEN, F.C.; FORSYTH, C.J. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas Disease. **Exp. Review of Clinical Pharmacol**. Vol 11(10): 943-957, 2018.

LANDER, N.; CHIURILLO, M.A; DOCAMPO, R. Signaling pathways involved in environmental sensing in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Microbiol**. VOL. 115(5): 819–828, 2021.

LEI, J., SUN L., Huang S., ZHU, C., *et al.* The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **Am. J. Transl. Res**. Vol. 11:3919–3931, 2019.

LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. **Int J Mol Sci**. Vol 22 (21), 2021.

MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. In: *Essays In Biochemistry*. [s.l: s.n.]. v. 51p. 15–30.

MIRANDA, M. R.; SAYÉ, M. M. Chagas Disease Treatment: From New Therapeutic Targets to Drug Discovery and Repositioning. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6517–6518, 13 dez. 2019.

MORAVEJ, H., MORAVEJ, Z., YAZDANPARAST M., *et al.* Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microb. Drug Resist**. Vol. 24 :747-767, 2018.

MOREIRA, C. M. DO N. *et al.* Knockout of the gamma subunit of the AP-1 adaptor complex in the human parasite *Trypanosoma cruzi* impairs infectivity and differentiation and prevents the maturation and targeting of the major protease cruzipain. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0179615, 2017.

MORILLA, Maria Jose; ROMERO, Eder Lilia. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine*, v. 10, n. 3, p. 465–481, 24 fev. 2015

NÔGA, D.A; BRANDÃO, L.E; CAGNI, F.C. *et al.* Anticonvulsant Effects of Fractions Isolated from *Dinoponera quadriceps* (Kempt) Ant Venom (Formicidae: Ponerinae). **Toxins (Basel)**. Vol 9 (1): 5, 2016.,

- NGUYEN, T.; WASEEM, M. Chagas Disease. **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls, 2021
- NORMAN, F. F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease: comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. **J Travel Med.** Vol. 26(7):taz060, 2019
- NORMAN, V.C.; PARMMINGER, T.; NASCIMENTO, F. The role of juvenile hormone in regulating reproductive physiology and dominance in *Dinoponera quadriceps* ants. **PeerJ.** Vol 7: e6512, 2019.
- NWAKA, Solomon; HUDSON, Alan. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.
- PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory
- OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p. 127-151, 1987.
- PARK, J., KANG, H.K., CHOI, M.C., et al. Antibacterial activity and mechanism of action of analogues derived from the antimicrobial peptide mBjAMP1 isolated from *Branchiostoma japonicum*. **J. Antimicrob. Chemother.** VOL. 73:2054–2063, 2018.
- PETTERSEN EF, GODDARD TD, HUANG CC, ET AL (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I.; Chagas Disease. **The Lancet.** Vol. 391(10115):82-94, 2018.
- PIACENZA, L.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *The Journal of experimental medicine*, v. 216, n. 3, p. 501–516, 2019.
- PONCE, N. E. et al. Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1832, n. 3, p. 485–94, mar. 2013.
- RASSI, A.; RASSI, A, MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet.** Vol 375(9723): 1388–402, 2010.
- SANTOS, E.F; SILVA, A.A.O; LEONY, L.M. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS Negl Trop Dis.** Vol 14(8):e0008445, 2020.
- SCHARFSTEIN, J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system: lessons from survival strategies of Trypanosoma cruzi. *Current opinion in hematology*, v. 25, n. 5, p. 347–357, 2018.
- SHORT, E, CAMINADE, C, THOMAS, B. Climate change contribution to the emergency or re-emergence of parasitic diseases. **Infect Dis Res Treat.** VOL. 10:1–7, 2017.

SUN, E., BELANGER, C.R., HANEY, E.F., HANCOCK R.E. Host defense (antimicrobial) peptides. In: Koutsopoulos S., editor. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Sawston, United Kingdom: **Woodhead Publishing**, 2018. [<https://doi.org/10.1016/C2015-0-02002-0>]

VENTURA-GARCIA, L, ROURA, M, PELL, C, et al. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. **PLoS Negl Trop Dis**. Vol 7: e2410, 2013

WHO. (2017). Chagas disease (American trypanosomiasis). Geneva, Switzerland: **World Health Organization** Media Centre. No 340.

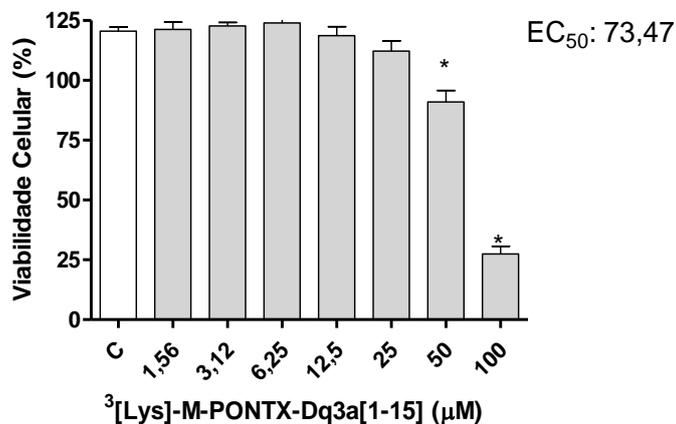
WHO. (2012) Research Priorities for Chagas Disease Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis **World Health Organization**. (2012)

Zhang Y (2009) I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. **Proteins Struct Funct Bioinforma**. <https://doi.org/10.1002/prot.22588>.

9. APÊNDICE A

9.APÊNDICE A

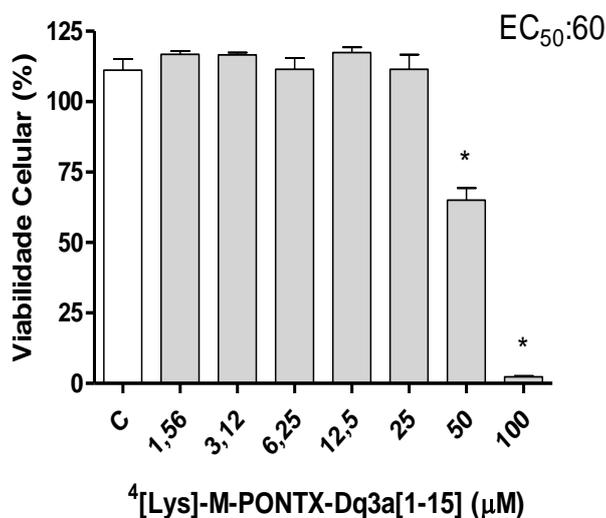
Figura 26 : Efeito citotóxico de $[Lys]^3$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05.

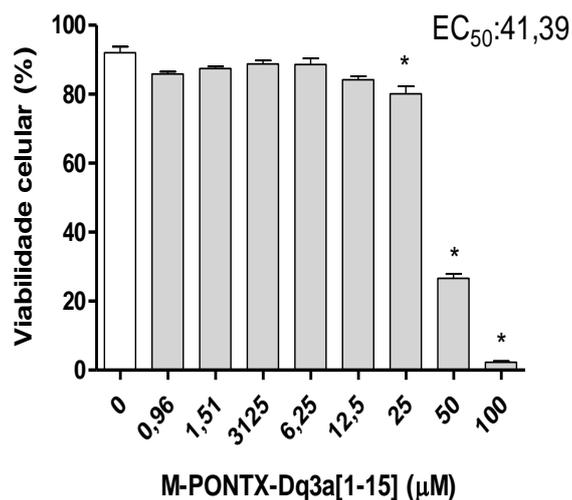
Figura 27 : Efeito citotóxico de $[Lys]^4$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05

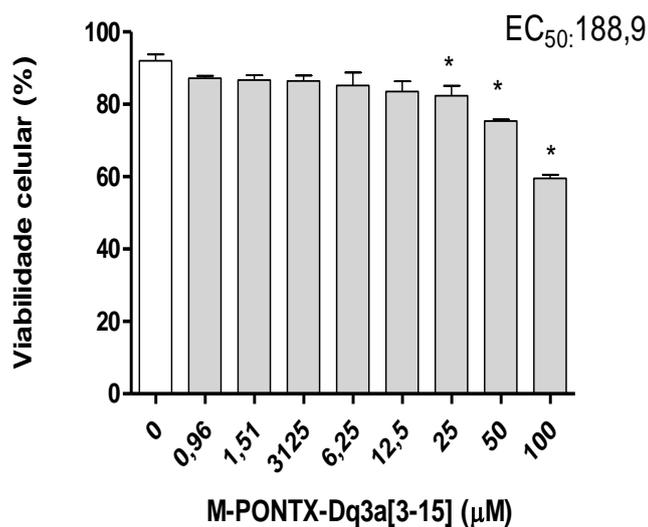
Figura 28 : Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15]sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p < 0,05$.

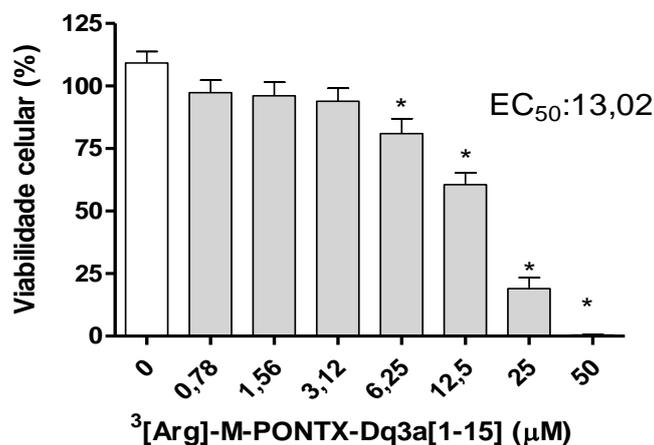
Figura 29: Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[3-15] sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p < 0,05$.

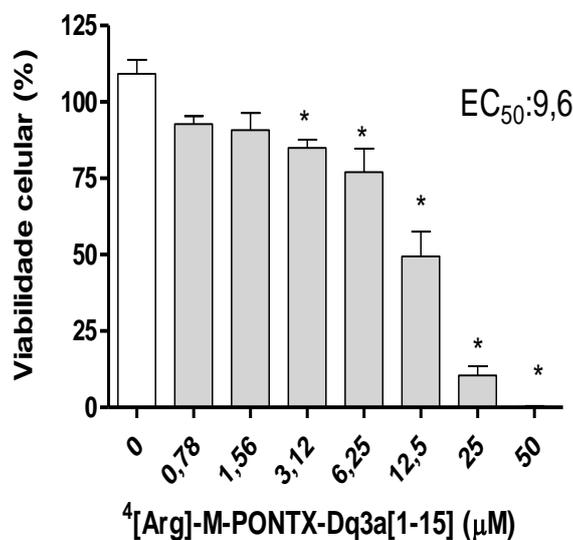
Figura 30: Efeito citotóxico de [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05.

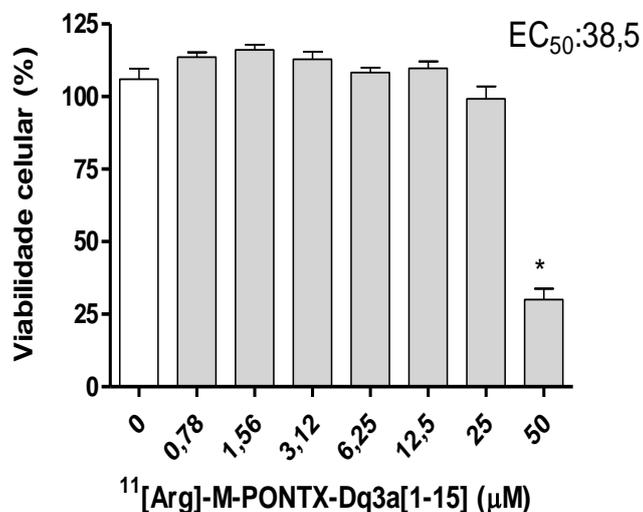
Figura 31 : Efeito citotóxico de [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

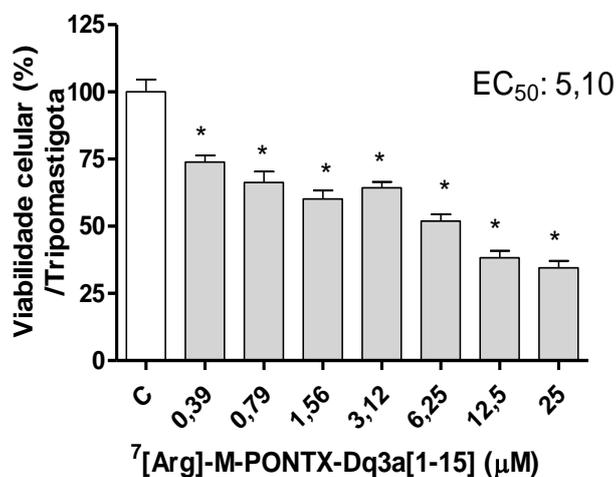
Figura 32 : Efeito citotóxico de [Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre LLC-MK2.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

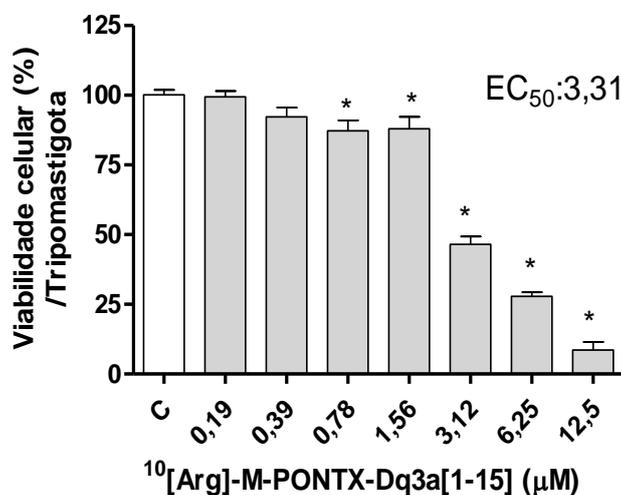
Figura 33 : Efeito citotóxico de [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi*.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

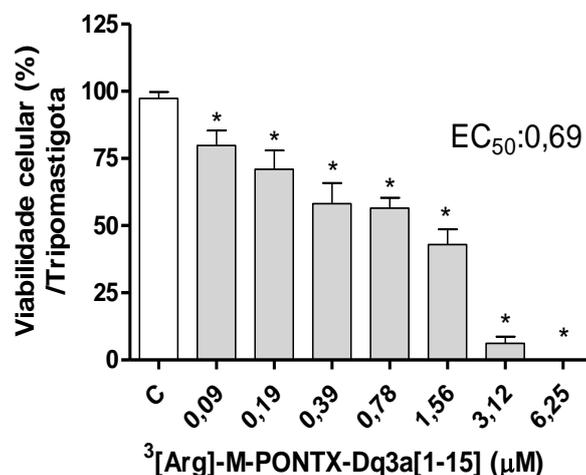
Figura 34 : Efeito citotóxico de $[\text{Arg}]^{10}$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi* .



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

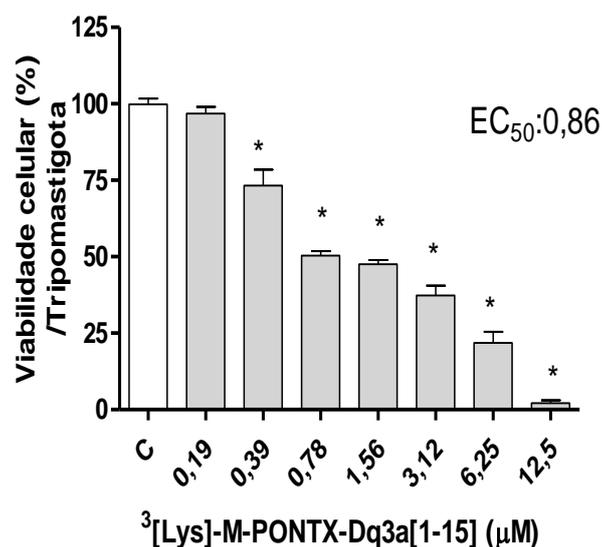
Figura 35 : Efeito citotóxico de $[\text{Arg}]^3$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi* .



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

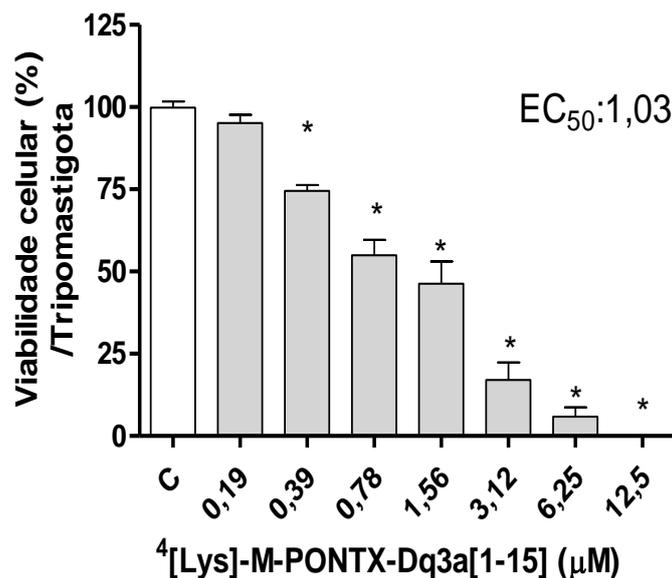
Figura 36 : Efeito citotóxico de $[Lys]^3$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi* .



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expresso em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

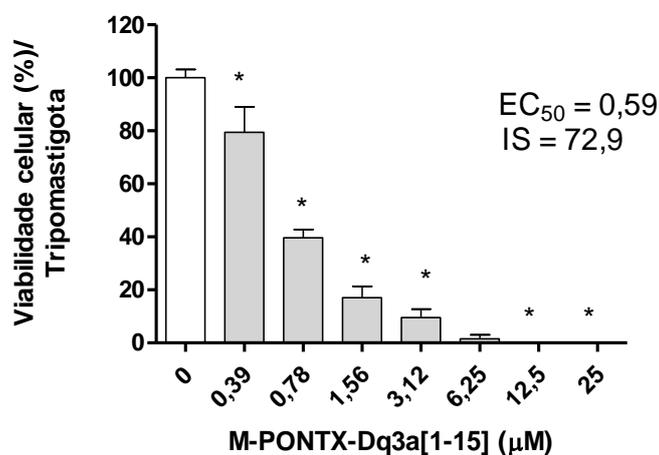
Figura 37 : Efeito citotóxico $[Lys]^4$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi* .



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05.

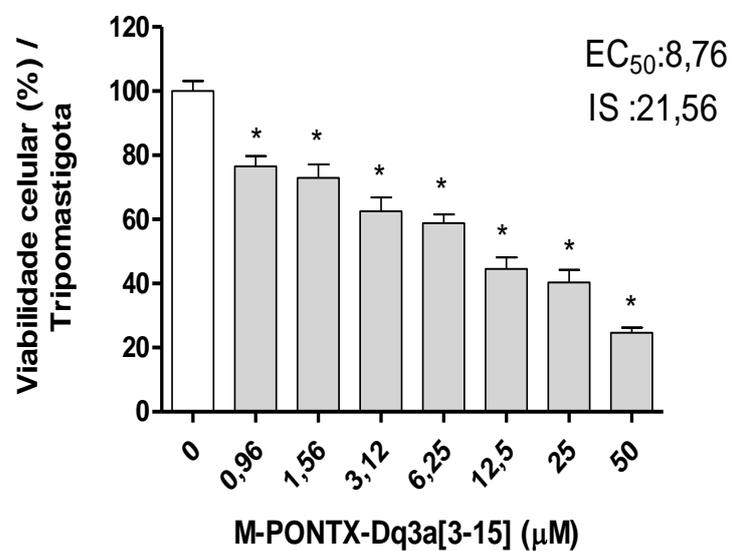
Figura 38 : Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi* .



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05.

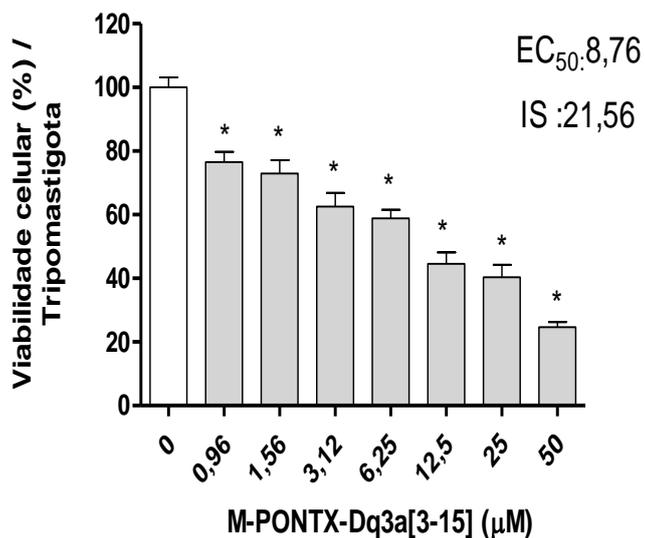
Figura 39: Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes ($n=3$), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p < 0,05$.

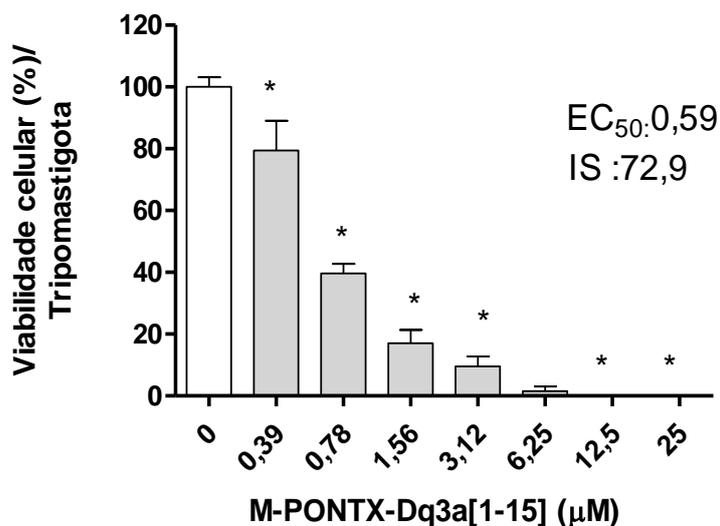
Figura 40: Efeito citotóxico sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expresso em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05.

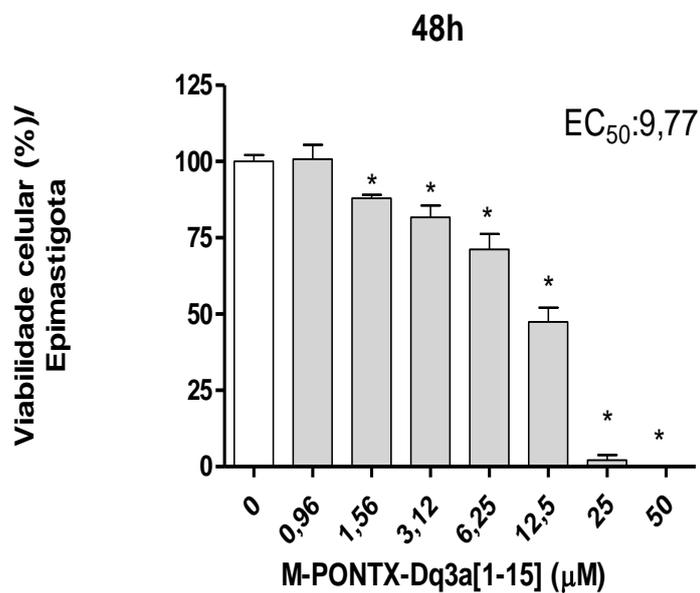
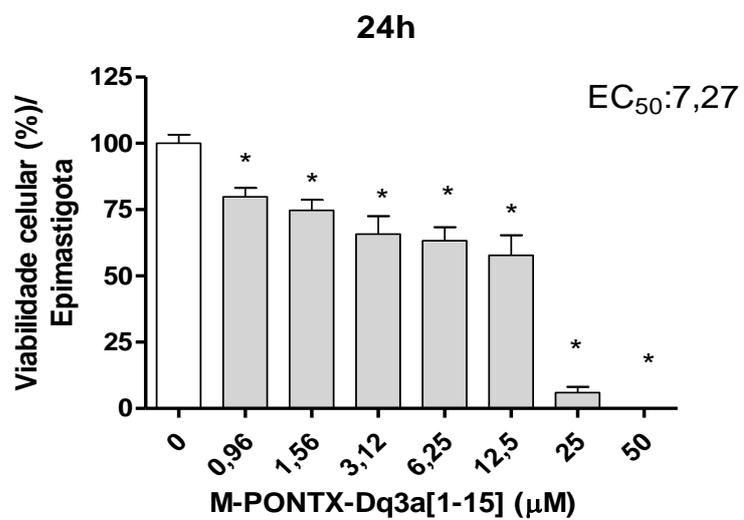
Figura 41 : Efeito citotóxico M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi* .

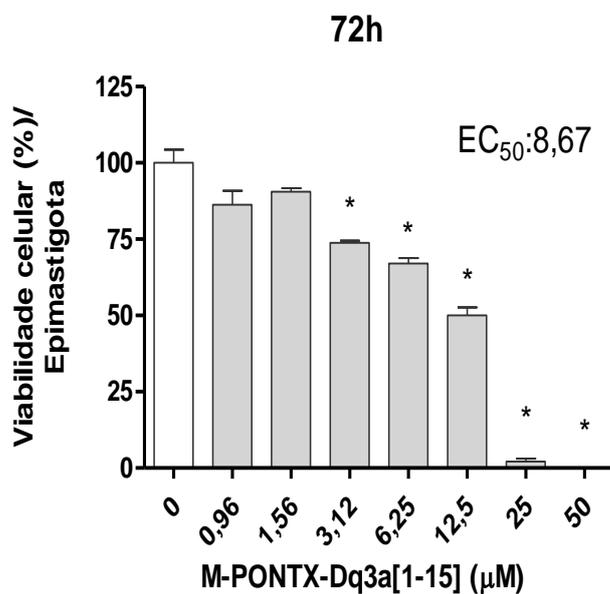


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expresso em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com *p<0,05.

Figura 42 : Efeito citotóxico de M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma epimastigota da cepa Y de *T.cruzi* .

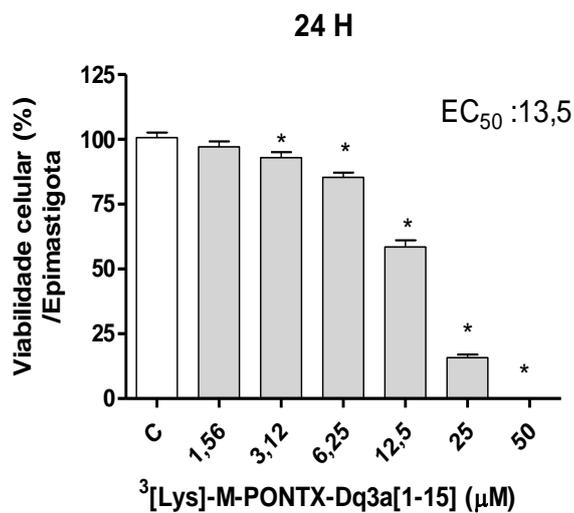


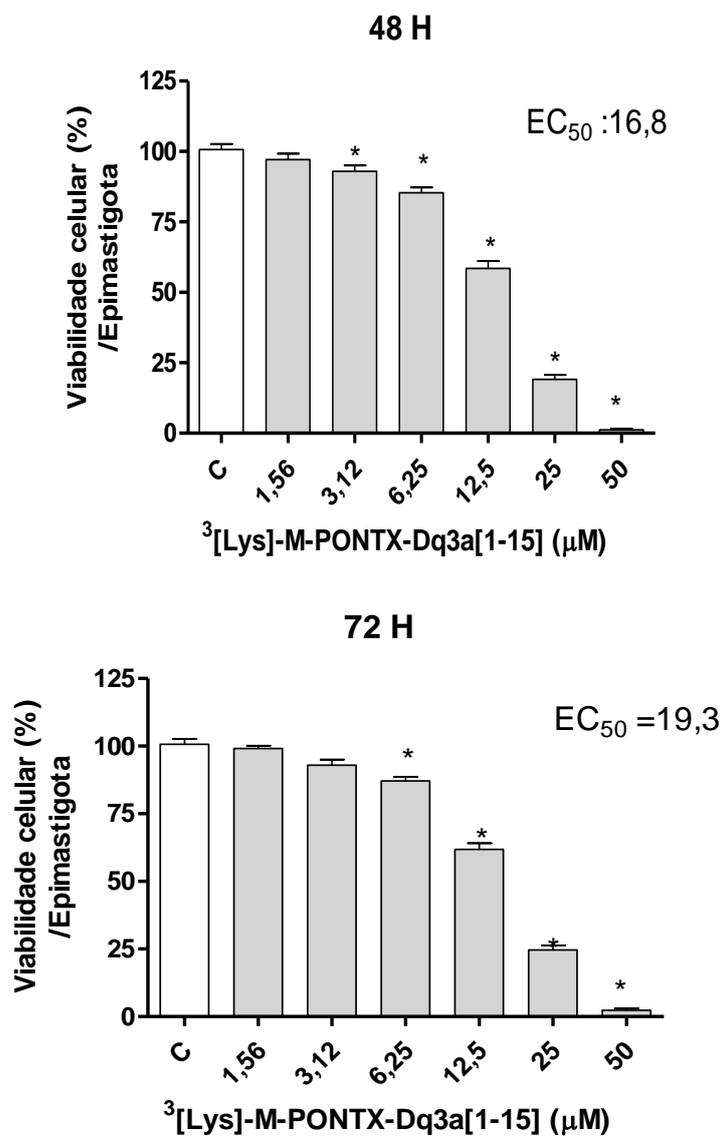


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=3), após 24h, 48h e 72h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p<0,05$.

Figura 43 : Efeito citotóxico de $[\text{Lys}]^3$ M-PONTX-Dq3a[1-15] sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi*.





Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n= 3), após 24h, 48h e 72h de tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15]. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste Bonferroni, com $*p < 0,05$.

9. APÊNDICE B



Rational design of a trypanocidal peptide derived from *Dinoponera quadriceps* venom

Marília Lopes Monteiro ^{a,1}, Dányá Bandeira Lima ^{a,1}, Katielle Albuquerque Freire ^b, Cibele Nicolaski Pedron ^b, Emanuel Paula Magalhães ^a, Brenna Pinheiro Silva ^a, Alicia Belén García-Jareño ^c, Cyntia Silva De Oliveira ^d, João Victor Serra Nunes ^a, Marcia Machado Marinho ^a, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes ^a, Mar Orzaéz ^c, Vani Xavier Oliveira Junior ^{b,d}, Alice Maria Costa Martins ^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 60430372, CE, Brazil

^b Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, 09210580, SP, Brazil

^c Targeted Therapies on Cancer and Inflammation Lab and Peptide Synthesis Platform, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, 46102, Spain

^d Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 04044020, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
M-PONTX-Dq3a
Trypanosoma cruzi
Chagas disease
Antimicrobial peptides
Ant venom peptide

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and affects millions of people worldwide, having no effective cure. The main sanitary emergency is related to patients with chronic infection, which accumulate comorbidities causing patient death. However, actual chemotherapeutic treatments do not effectively address the chronic forms of the disease. Invertebrates are a relevant source of antimicrobial peptides (AMPs) as part of the innate immune system for their protection. The AMP M-PONTX-Dq3a, isolated from the *Dinoponera quadriceps* ant venom, has shown very effective antimicrobial and trypanocidal activities. Although M-PONTX-Dq3a has better activity than the current therapies, the peptide length has limited its possibilities to reach clinical application. In this investigation, we aimed to dissect the trypanocidal effect of M-PONTX-Dq3a fragments and to study the activity of substituted analogs, to improve not only peptide trypanocidal activity and bioavailability, but also production costs. Our studies have led to the identification of two smaller peptides, M-PONTX-Dq3a [1-15] and [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [3-153-15] with similar trypanocidal activities that the parent peptide has against the three forms of *T. cruzi* benzimidazole-resistant Y strain. Both peptides represent promising candidates to develop novel and effective trypanocidal bio-therapeutic agents, opening new avenues for the treatment of chronic patients.

1. Introduction

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, affecting 6–7 million individuals in Latin America [1]. Moreover, due to the immigration of infected people, this disease has spread to non-endemic countries, increasing the health problem worldwide. This disease has two clinical phases, with the acute phase being characterized by high parasitemia and a chronic phase that can be symptomatic or asymptomatic. The symptomatic chronic phase affects up to 30–40% of cases and is characterized by cardiomyopathy, arrhythmias, megavisceras and, more rarely, polyneuropathy and stroke [2].

The treatment is based on chemotherapy carried out with two drugs, which are efficient in acute infections, but they have severe side effects and fail to eradicate the intracellular form of the parasites (amastigote) in the chronic phase. Chronic patients show relevant comorbidities that increase the necessity for medical care, decrease their quality of life, work productivity and finally, in a high percentage of patients, culminate in death, representing an annual global economic burden. Therefore, the development of alternative drugs is an urgent medical need.

After years of research to improve peptide properties and delivery strategies, several peptides are already being used in clinical practice for different applications and, in particular, 7 antimicrobial peptides

* Corresponding author.

E-mail address: martinalice@gmail.com (A.M.C. Martins).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114624>

Received 11 May 2022; Received in revised form 6 July 2022; Accepted 21 July 2022

Available online 31 July 2022

0223-5234/© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

(AMPs) have already been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA; gramicidin, daptomycin, colistin, vancomycin, oritavacin, dalbavancin and telavancin) [3,4]. Venoms from invertebrates constitute a rich source of AMPs. The diverse modes of action of AMPs on protozoan targets, and the prospection of novel AMPs isolated from venomous arthropods with therapeutic potential, have turned these peptides into interesting tools to search for novel clinical agents to treat protozoan-borne diseases. Their antiprotozoa activity could be direct, disrupting membranes, or aiming internal targets, including DNA, RNA, and protein synthesis, lysosomal bilayer, disrupting key enzymatic activities, organelles related with calcium storage, and mitochondria [5].

AMPs from the *Dinoponera quadricaps* ant venom, also called dinoponeratoxins, were previously identified as trypanocidal agents. Among the different AMPs, M-PONTX-Dq3a was identified as the most potent peptide that showed the highest selectivity index (SI = 80) [6]. In this investigation, to improve peptide capacity of reaching clinical use, we have minimized the sequence required to maintain M-PONTX-Dq3a activity. For this purpose, we have evaluated the trypanocidal activity of fragments and substituted analogs derived from the M-PONTX-Dq3a original sequence and elucidated their cell death mechanism of action.

2. Method

2.1. Solid-phase peptide synthesis, purification, and analysis

The solid-phase peptide synthesis was performed in a peptide synthesizer (PS3-Sync Technologies/LibertyBlue CEM corporation), using the fluoromethylloxycarbonyl (Fmoc) strategy, and the peptides were anchored to a Rink Amide resin, with a substitution degree of 0.52 mmol g⁻¹. The dry protected peptidyl-resin was cleaved by exposure to TFA/anisole/water (95:2.5:2.5, v:v:v) for 2 h at room temperature [7]. The crude peptides were precipitated with anhydrous diethyl ether, separated from the ether-soluble reaction components by filtration, extracted from the resin with acetonitrile 60% in water, and lyophilized [8]. The crude peptides were purified by semi-preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography on a Delta Prep 600 (Waters Associates)/Prominence LC-20A (Shimadzu) and the selected fractions containing the purified peptides were pooled and lyophilized. The peptides were characterized by liquid-chromatography electrospray-ionization mass spectrometry using a Model 6130 Infinity mass spectrometer coupled to a Model 1260 high-performance liquid chromatography system (Agilent) [7]. The peptides obtained were named M-PONTX-Dq3a [1–15], M-PONTX-Dq3a [3–15], M-PONTX-Dq3a [12–23], [Lys]³ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Lys]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]³ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a [1–15].

2.2. Parasites and cell culture

LLC-MK2 kidney cells (ATCC CCL-7), epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* benznidazole-resistant Y strain were kindly donated by Laboratório de Bioquímica de Parasitas (Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil). The LLC-MK2 cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Virocell, São Paulo, Brazil) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin 100 U mL⁻¹ and streptomycin 130 µg mL⁻¹). These cells were infected with trypomastigote forms of *T. cruzi* to obtain the amastigote forms and maintain the trypomastigote forms. The infection cycle was maintained weekly at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM medium (Virocell, São Paulo, Brazil) supplemented with antibiotics (penicillin 100 U mL⁻¹ and streptomycin 130 µg mL⁻¹) and 2% FBS. Epimastigotes were maintained weekly in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium with 10% FBS at 28 °C [6].

2.3. Effect on *T. cruzi* trypomastigote forms

Trypomastigote forms are the non-proliferative infective form of *T. cruzi*, which corresponds to the blood circulating form in the mammalian host. The trypomastigote forms of *T. cruzi* obtained by infecting LLCMK2 cells with trypomastigotes in T-25/75 cm² flasks were harvested (800 g for 7 min), plated in 96-well plates (1 × 10⁶ parasites/well) with 2-fold dilutions of fragments and analogs of M-PONTX-Dq3a (concentration ranging from 12.5 to 0.19 µmol L⁻¹ of peptide), using PBS as the negative control and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM medium (Virocell, São Paulo, Brazil) supplemented with antibiotics (penicillin 100 U mL⁻¹ and streptomycin 130 µg mL⁻¹) and 10% FBS [9]. After 24 h of incubation, cell viability was measured by counting them in a hemocytometer chamber. Benznidazole at 2-fold dilution concentrations ranging from 1000 to 15.6 µmol L⁻¹ was used as the positive control. Parasites treated with sterile PBS were considered negative controls (100% viability) and all experiments were carried out in triplicate.

2.4. Cytotoxicity to mammalian cells (LLC-MK2)

Cell viability was measured using a standard 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay [10]. Briefly, LLC-MK2 cells were plated in DMEM medium with 10% FBS supplemented with antibiotics (penicillin 100 U mL⁻¹ and streptomycin 130 µg mL⁻¹), treated with fragments and analogs of M-PONTX-Dq3a (100–1.56 µmol L⁻¹ of peptide) and benznidazole and incubated at 37 °C for 24 h and 48h. The cells were incubated for 4 h in the presence of MTT (Amresco, Ohio, USA; 5 mg mL⁻¹); after that, a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS; Vetec, São Paulo, Brazil) solution was added to solubilize the formazan product. Cell viability was assessed by absorbance at 570 nm on a microplate reader (Biochrom® Asys Expert Plus) [11]. Cells treated with sterile PBS were considered negative controls (100% viability). Benznidazole at 2-fold dilution concentrations, ranging from 1000 to 15.6 µmol L⁻¹, was used as the positive control. The half-maximal effective concentration (EC₅₀) was determined by non-linear regression and the selectivity index (SI) was calculated by the formula: EC₅₀ of LLC-MK2/EC₅₀ of trypomastigote forms of 24 h [12]. This SI value was used to select the promising peptides (SI > 50).

2.5. Effect on *T. cruzi* amastigote forms

Amastigote forms are responsible for maintaining the infection and the chronification of Chagas disease. The effects of M-PONTX-Dq3a [1–15] and [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] on the amastigote forms were assessed. Briefly, LLC-MK2 cells were seeded on 24-well plates containing coverslips (13 mm of diameter) and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and antibiotics (penicillin 100 U mL⁻¹ and streptomycin 130 µg mL⁻¹), at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere, for 24 h. Next, the medium was removed and the cells were infected with trypomastigote forms (parasite-host cell ratio of 20:1) in DMEM medium containing 2% FBS. After 48 h of incubation, the infected cells were washed and treated with EC₅₀, 2 x EC₅₀ and 4 x EC₅₀ of trypomastigotes of each peptide. The coverslips were collected after 24 and 48 h, washed with PBS, fixed in Bouin's solution, and stained with Giemsa [13]. Non-treated infected cells were used as the negative control. Amastigote cells per 100 cells were determined by counting 300 cells from the different groups obtained from different wells. The EC₅₀ was determined by non-linear regression and the selectivity index (SI) was calculated by the formula: EC₅₀ of LLC-MK2/EC₅₀ of amastigote forms for each time.

2.6. Effect on *T. cruzi* epimastigote forms

Epimastigote forms correspond to the proliferative insect vector-borne stage and are present in the digestive tract of the triatomine insects. The epimastigote forms of *T. cruzi* benznidazole-resistant Y strain

at the exponential stage were harvested (800 g for 5 min), plated in 96-well plates (1×10^5 parasites/well), and exposed to M-PONTX-Dq3a [1–15] and [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] at 2-fold dilution concentrations ranging from 100 to 0.78 in LIT medium supplemented with antibiotics (penicillin 100 U mL⁻¹ and streptomycin 130 µg mL⁻¹) and 10% FBS. Benznidazole at 2-fold dilution concentrations ranging from 1000 to 15.6 µmol L⁻¹ was used as the positive control. Parasite growth inhibition was quantified in a hemocytometer chamber after incubation at 28 °C for 24, 48, and 72 h. The parasites treated with sterile PBS medium were considered negative controls (100% viability) and all experiments were carried out in triplicate [9].

2.7. Cell death pathway assays of *T. cruzi*

Flow cytometry was performed to investigate the cell death pathway of the epimastigote forms of *T. cruzi* at the exponential stage when exposed to EC₅₀ of M-PONTX-Dq3a [1–15] and [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15]. Briefly, the parasites were treated with each peptide in LIT medium and incubated for 24 h, washed and stained with different probes (according to the manufacturer's instructions) to evaluate the cell death pathway. Phycoerythrin-conjugated annexin V (Annexin V-PE) and/or 7-AAD (7-aminoactinomycin D; BD Pharmingen, California, USA) were used to evaluate the externalization of phosphatidylserine and/or membrane damage; 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; 20 mmol L⁻¹) was used to evaluate the reactive oxygen species (ROS) formation; and rhodamine 123 (10 µg mL⁻¹) was used to evaluate mitochondrial transmembrane potential. Next, the samples were screened in a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA), in which 10,000 live events were collected and analyzed using the CellQuest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Benznidazole (125 µM) was used as the positive control of Annexin V-PE/7-AAD and rhodamine 123 probes, while luperox (50 µM) was used as the positive control of DCFH-DA probe. The epimastigotes treated with PBS were used as the negative controls and all experiments were carried out in triplicate.

2.8. Scanning electron microscopy (SEM)

The epimastigote forms were treated with the EC₅₀ values of M-PONTX-Dq3a [1–15] or [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] and incubated for 12 h. After incubation, the parasites were fixed for 2 h with 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), washed, dehydrated with a gradient series of ethanol, dried with CO₂, coated in gold, and analyzed in a FEG Quanta 450 scanning electron microscope (FEI, Oregon, USA) [6].

2.9. Statistical analysis

The assays were performed in triplicate of three independent experiments and the obtained results were expressed as mean ± standard error. Cell viability was calculated as a percentage compared to the untreated cell. The EC₅₀ (half effective concentration) was determined by non-linear regression with a 95% confidence interval. Statistical comparisons were analyzed using ANOVA with Bonferroni's post-test using the GraphPad Prism® program, version 5.0.

3. Results

3.1. Trypanocidal potential of M-PONTX-Dq3a fragments

The M-PONTX-Dq3a (Dq3a [1–23]) AMP is naturally cleaved in the ant venom gland on two N-terminal fragments, M-PONTX-Dq3b (Dq3a [1–13]), with low trypanocidal effect and M-PONTX-Dq3c (Dq3a [1–11]) with almost no trypanocidal activity [6]. Based on these results, two possible scenarios were evaluated; a) some amino acids were missing from the N-terminal part of the peptide, which are relevant for

the trypanocidal activity or b) the C-terminal region of M-PONTX-Dq3a is the main responsible for the trypanocidal activity. To elucidate this question three fragments derived from the original peptide sequence were designed: a C-terminal fragment complementary to M-PONTX-Dq3c, (Dq3a [12–23]), a N-terminal fragment with 15 amino acids (Dq3a [1–15]) and a N-terminal fragment from the third amino acid up to the number 15 (Dq3a [3–15]) (Fig. 1). The biophysical characterization of these three peptides showed that all of them had the same net charge, but M-PONTX-Dq3a [12–23] had the lowest hydrophobicity (H) and hydrophobic moment (µH), while M-PONTX-Dq3a [1–15] had the highest H and µH (Fig. 1; Table 1). All of them were synthesized and cell death-inducing capability was evaluated against host cells (LLC-MK2 cells) and trypomastigote forms of *T. cruzi*. Interestingly, the C-terminal peptide M-PONTX-Dq3a [12–23] showed no effect at any of the tested concentrations, suggesting that the N-terminal region of the AMP should be relevant for the antiparasitic activity. Confirming this hypothesis, the Dq3a [1–15] peptide showed an EC₅₀ at 0.59 ± 0.05 µM against trypomastigote forms and a selectivity index (SI) 72.9, while Dq3a [3–15] showed an EC₅₀ at 8.76 ± 2.33 µM against trypomastigote forms and SI of 21.56 (Table 2). Both N-terminal short peptides showed better activity than that of the current standard-of-care drug, Benznidazole (EC₅₀ = 161.4 ± 31.8 µM, SI = 3.11). Of them, M-PONTX-Dq3a [1–15] showed almost the same potency and selectivity than the full-length peptide [6]. Thus, the design and synthesis of M-PONTX-Dq3a [1–15] analogs were chosen to improve selectivity.

3.2. Trypanocidal potential of M-PONTX-Dq3a(1–15) analogs

M-PONTX-Dq3a [1–15] analogs were designed with arginine and lysine substitutions in hydrophilic positions (3, 4, 7, 10, and 11). The five substituted Arg-M-PONTX-Dq3a [1–15] and three substituted Lys-M-PONTX-Dq3a [1–15] analogs were evaluated against host cells (LLC-MK2 cells) and trypomastigote forms of *T. cruzi*.

They showed a net charge between +3 and +4, H between 0.601 and 0.781, and µH between 0.412 and 0.511 (Fig. 1; Table 1). It is important to note that single substitutions by Arginine ([Arg]³-M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]⁷-M-PONTX-Dq3a [1–15], [Arg]¹⁰-M-PONTX-Dq3a [1–15] [Arg]¹¹-M-PONTX-Dq3a [1–15]), clearly decreased the selectivity index of the parental peptide. However, the decrease was not so significant with Lysine substitutions [Lys]⁴-M-PONTX-Dq3a [1–15] and [Lys]¹⁰-M-PONTX-Dq3a [1–15]. Interestingly, the [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] analog showed a higher SI than the parental peptide (85.3) (Table 2).

3.3. Trypanocidal effect and cell death mechanism of action of optimized peptides

Because of the promising results obtained against the trypomastigote and LLC-MK2 cells, Dq3a [1–15] and [Lys]³-Dq3a [1–15] were tested against the epimastigote forms (the proliferative insect vector-borne stage of the parasite). Interestingly, Dq3a [1–15] showed the lowest EC₅₀ values at the three different times of incubation (Table 3).

Thus, Dq3a [1–15] and [Lys]³-Dq3a [1–15] were tested against the amastigote forms (the proliferative intracellular stage of the parasite) of *T. cruzi* and both peptides were able to decrease the number of amastigotes per 100 cells after 24 and 48 h, showing EC₅₀ values of 1.32 and 0.91 µM for 24h of incubation and 0.37 and 0.28 µM respectively. The SI of Dq3a [1–15] and [Lys]³-Dq3a [1–15] for amastigote form at 24h were 32 and 80, while increased to 96 and 156 at 48h, respectively (Table 4).

Flow cytometry and scanning electron microscopy (SEM) were performed to assess the action mechanism of these peptides.

To evaluate the parasite death mechanism of action, the parasites were treated with the peptides, stained either with 7AAD (viability dye that enters the cell through a plasma membrane lesion) and Annexin-V (AX) (apoptosis marker by the externalization of phosphatidylserine),

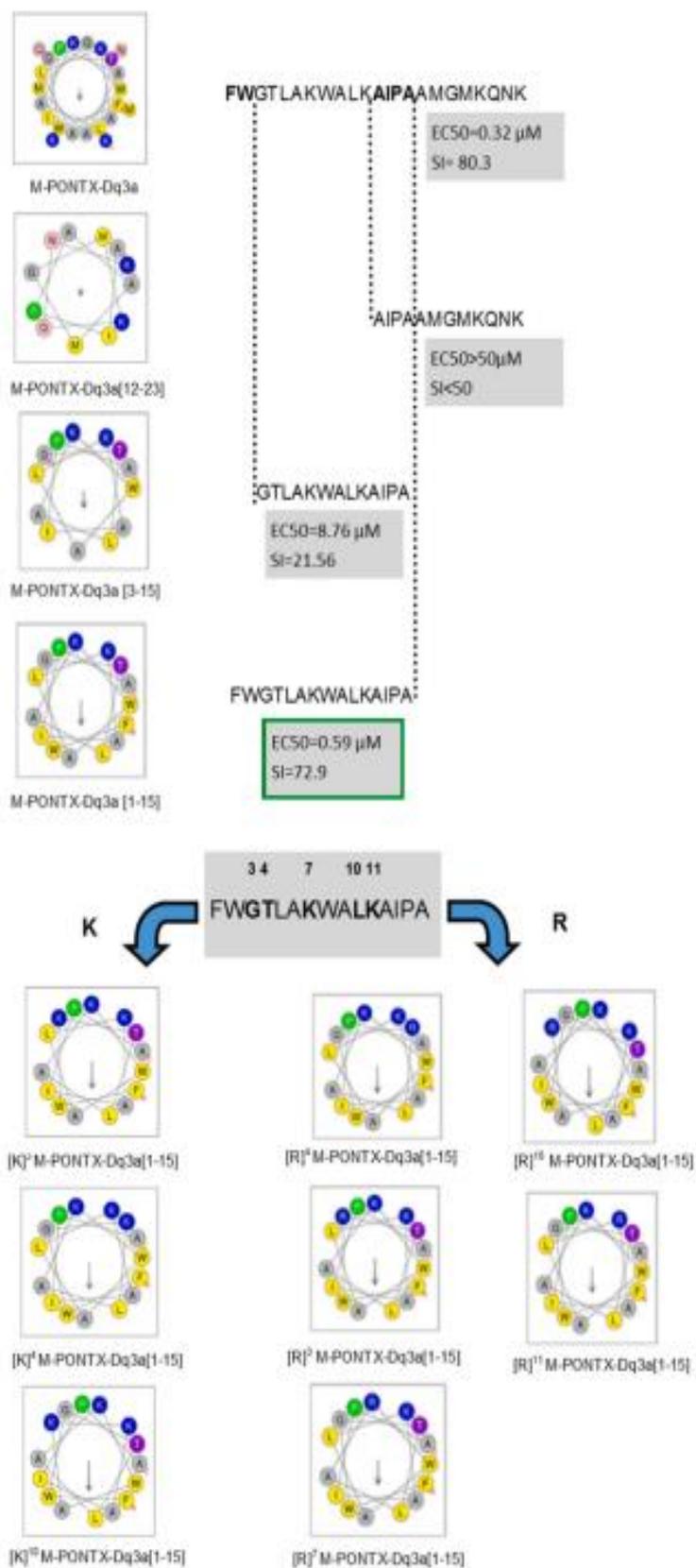


Fig. 1. Helical wheel projections of M-PONTX-Dq3a fragments and its analogs. Yellow and grey circles indicate hydrophobic amino acids, blue, purple, red and pink ones represent hydrophilic amino acids.

Table 1
Physicochemical properties of fragments and analogs of M-PONTX-Dq3a.

Peptide	Sequence	Molecular Weight	Z	H	μ H	Yield
M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGTLAKWALKAIPA	1673.0	3	0.782	0.411	0.60
M-PONTX-Dq3a [3–15]	GTLAKWALKAIPA	1339.62	3	0.592	0.277	0.50
M-PONTX-Dq3a [12–23]	AIPAAMGMBQNK	1259.55	3	0.259	0.128	0.50
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWKTLAKWALKAIPA	1743.16	4	0.716	0.459	0.41
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGKLAKWALKAIPA	1699.10	4	0.699	0.465	0.22
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGTLAKWAKKAIPA	1687.05	4	0.603	0.510	0.60
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWKTLAKWALKAIPA	1772.14	4	0.715	0.460	0.90
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGRLAKWALKAIPA	1728.08	4	0.697	0.466	0.61
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGTLARWALKAIPA	1701.02	3	0.781	0.412	0.37
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGTLAKWARKAIPA	1716.03	4	0.601	0.511	0.61
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a [1–15]	FWGTLAKWALRAIPA	1701.02	3	0.781	0.412	0.66
M-PONTX-Dq3a [6]	FWGTLAKWALKAIPAAMGMBQNK	2561.13	5	0.509	0.248	Nd

z (net charge), H (hydrophobicity), μ H (hydrophobic moment), according to HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>). Nd: not done.

Table 2
Effect of M-PONTX-Dq3a fragments and analogs against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* Y strain and LLC-MK2 mammalian cells and their respective selectivity index (SI).

Peptides	LLC-MK2 (EC ₅₀)	Trypomastigote (EC ₅₀)	SI
M-PONTX-Dq3a [12–23]	>50	>50	–
M-PONTX-Dq3a [3–15]	188.86 ± 1.77	8.76 ± 2.33	21.56
M-PONTX-Dq3a [1–15]	43.05 ± 0.05	0.59 ± 0.05	72.9
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a [1–15]	73.4 ± 0.08	0.86 ± 0.09	85.3
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	60 ± 0.07	1.03 ± 1.7	58.2
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1–15]	97.0 ± 2.9	1.09 ± 1.5	31.5
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a [1–15]	13.03 ± 1.71	0.69 ± 0.07	18.8
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	9.6 ± 1.2	1.09 ± 0.05	8.8
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a [1–15]	55 ± 1.2	5.10 ± 0.8	10.8
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1–15]	25.07 ± 0.06	3.31 ± 0.09	7.5
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a [1–15]	38.5 ± 1.5	1.54 ± 0.07	24.7
Benzimidazole	502.6 ± 57.8	161.4 ± 31.8	3.11
M-PONTX-Dq3a [6]	25.7 ± 2	0.32 ± 0.03	80.3

EC₅₀ values are expressed in μ M. Data are expressed as means ± SEM of three independent experiments.

Table 3
Effect of M-PONTX-Dq3a fragments and analogs against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* Y strain.

	M-PONTX-Dq3a [1–15]	[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a [1–15]	Benzimidazole	M-PONTX-Dq3a [6]
EC ₅₀ /24h	7.2 ± 1.4	13.5 ± 1.5	115.1 ± 16.3	4.7 ± 1
EC ₅₀ /48h	9.7 ± 0.9	16.8 ± 0.08	37.4 ± 5.6	3.6 ± 0.5
EC ₅₀ /72h	8.7 ± 0.6	19.3 ± 0.06	22.1 ± 2.9	2.4 ± 0.4

EC₅₀ values are expressed in μ M. Data are expressed as means ± SEM of three independent experiments.

Table 4
Effect of M-PONTX-Dq3a and [Lys]³ M-PONTX-Dq3a [1–15] against amastigote form of *Trypanosoma cruzi* Y strain and LLC-MK2 mammalian cells and their respective selectivity index (SI).

	Amastigotes EC ₅₀ /24h	LLC-MK2 EC ₅₀ /24h	SI/24h	Amastigotes EC ₅₀ /48h	LLC-MK2 EC ₅₀ /48h	SI/48h
M-PONTX-Dq3a [1–15]	1.32 ± 0.38	43.05 ± 0.05	32.61	0.37 ± 0.17	35.78 ± 4.12	96.7
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a [1–15]	0.91 ± 0.2	73.4 ± 0.08	80.65	0.28 ± 0.15	43.85 ± 3.5	156.6

EC₅₀ values are expressed in μ M. Data are expressed as means ± SEM of three independent experiments.

DCF (a marker of reactive species of oxygen formation), or Rhodamine 123 (a marker of mitochondrial transmembrane potential) and the stained cell populations were analyzed by flow cytometry.

After 24 h of incubation, the EC₅₀ value of Dq3a [1–15] increased the 7AAD+/AX-population by 11.29% (Fig. 2), led to a higher formation of ROS (40%) (Fig. 3A), and reduced 65% of the mitochondrial transmembrane potential (Fig. 3B). The EC₅₀ value of [Lys]³-Dq3a [1–15] led to a 23.93% increase of the 7AAD+/AX-population (Fig. 2), a higher formation of ROS (58%) (Fig. 3A), with no significant alterations in the mitochondrial transmembrane potential (Fig. 3B). The positive control, benzimidazole, showed a 5.71% increase of the 7AAD+/AX-population (Fig. 2) and a 70% decrease in the mitochondrial transmembrane potential (Fig. 3B). Luperox, the positive control of DCF, led to a higher formation of ROS (37%) (Fig. 3A).

These results of SEM images showed degradation of the parasite membrane after treatment with both peptides (Fig. 4), corroborating with the increase on 7AAD+/AX-populations.

4. Discussion

Antimicrobial peptides are promising molecules for the development of drugs for the treatment of Chagas disease. However, natural AMPs have some limitations, such as lack of stability *in vivo*, toxicity, and big size (>20 a.a.), which increase the production costs [14]. In this investigation, we were able to design a novel AMP with a better trypanocidal effect than its parent peptide, but with a reduced number of amino acids and lower toxicity.

Recently, we evaluated the trypanocidal effect of dinoponeratoxins, and the M-PONTX-Dq3a (23 a.a.) peptide showed the highest potency (EC₅₀ of 0.32 μ M on trypomastigotes) and selectivity index (80). As explained before, this peptide is naturally cleaved (in the venom gland) in two N-terminal fragments M-PONTX-Dq3b and M-PONTX-Dq3c, which have 13 and 11 amino acids, respectively, which drastically reduced their trypanocidal activity [6]. Therefore, the design of new non-natural fragments derived from the parental peptide to identify the smaller sequence with better anti-parasitic effect was suggested.

Our results have demonstrated that peptides derived from the C-terminal region Dq3a [12–23] lose the parental peptide activity, as well as the N-terminal fragment Dq3a [3–15]. However, Dq3a [1–15] showed almost the same anti-parasitic activity than the parental peptide (EC₅₀ = 0.59 μ M; SI 72.9), with the advantages of having a smaller size and

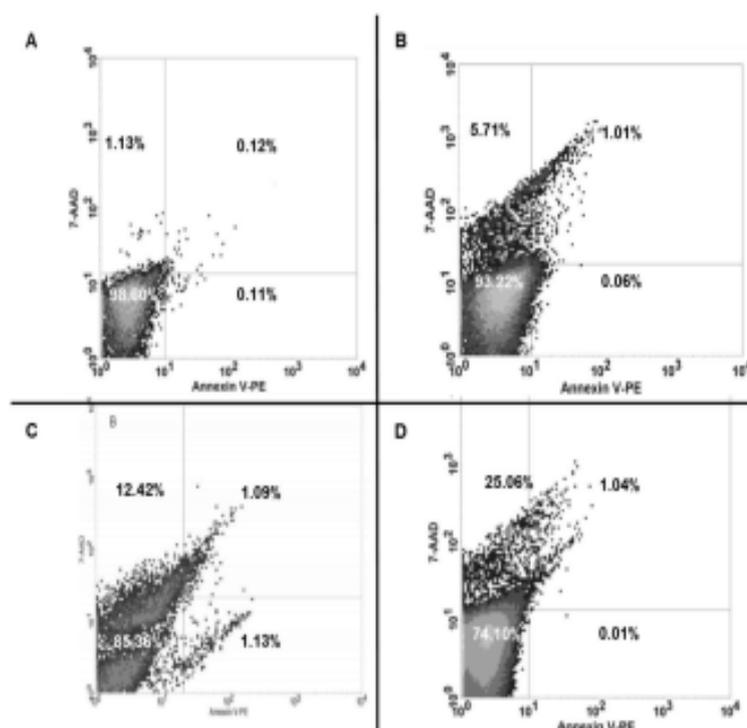


Fig. 2. Optimized trypanocidal peptides induce cell death in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. Flow cytometry evaluation of necrosis/apoptosis-like cell death of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. (A) Non-treated epimastigote forms, (B) treated with benznidazole 125 μ M, (C) treated with M-PONTX-Dq3a [1–15] at 7.2 μ M, and (D) [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] at 13.5 μ M for 24 h labeled with phycoerythrin-conjugated annexin V (Annexin V-PE) and/or 7-AAD (7-aminoactinomycin D). Percentages values are averages of 10,000 live events from three independent experiments (CT: control in PBS).

lower toxicity.

Phe and Trp residues are nonpolar and their aromatic side chains may favor hydrophobic interactions with lipids in biomembranes [15, 16]. This could explain the loss of trypanocidal potential of Dq3a [3–15] with the Phe and Trp absence.

According to the WHO/TDR for a novel antitrypanosomal agent, one of the main criteria for considering a molecule as a potential hit is the need to obtain a SI higher than 50 [12]. M-PONTX-Dq3a [1–15] has higher SI values than the criterion limit, but lower than M-PONTX-Dq3a, so we decided to improve this fragment.

The design strategies include substitutions of non-charged polar residues for arginine or lysine (charged polar residues) to increase the selectivity to the negatively charged phospholipids present in the membranes of microorganisms [17]. Based on the previous results, we decided not to make any changes to the Dq-3a [11–15] sequence and to the two first amino acids Dq3a [1, 2], which seem to be important for the biological effect. Therefore, we changed the hydrophilic positions 3, 4, 7, 10, and 11, generating five Arg-substituted analogs and three Lys-substituted analogs.

In a recent study conducted by our research group, Arg-substitutions were able to increase the selectivity on *T. cruzi* benznidazole-resistant Y strain [18], but in the present investigation, one Lys-substituted peptide ([Lys]³-Dq3a [1–15]) showed the highest effect and SI. Accordingly, [Arg]³ and [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] showed almost the same physicochemical parameters, but great differences regarding their biological effects. The [Arg]³-substituted analog showed a 5.6-fold higher toxicity and lower selectivity than the [Lys]³-substituted analog. Thus, we considered M-PONTX-Dq3a [1–15] and [Lys]³-Dq3a [1–15], the better candidates to become potential anti-parasitic hits.

Nifurtimox and benznidazole, the two current treatments for Chagas disease, have high toxicity and severe side effects. They also have lower than 20% of efficacy in the chronic stage of the disease [19], as a consequence of their low penetrability into cells and thus, the incapacity to reach the amastigote form, which is the one responsible for the infection maintenance [20]. In the present investigation, we have demonstrated that both M-PONTX-Dq3a [1–15] and [Lys]³-Dq3a [1–15]

are able to decrease the number of amastigote forms of *T. cruzi* benznidazole-resistant Y strain in cell cultures, showing selectivity to the parasite 90 and 146 times higher than to the host cells at 48 h of incubation in this developmental form. Furthermore, our results indicate that [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] has a potency against trypomastigote forms 187-fold and parasite selectivity 28-fold higher than benznidazole.

Variation in the susceptibility of *T. cruzi* to benznidazole is also a major cause of treatment failure [21], so a benznidazole-resistant *T. cruzi* population, strain Y, was developed a few years ago [22]. The benznidazole-resistant *T. cruzi* strain Y has been widely used [23, 24] by our research group and worldwide with the aim of finding new anti-chagasic models. Our results of benznidazole with strain Y are similar to those in the literature.

Cell death mechanisms of autophagy, apoptosis-like cell death and necrosis have been found in pathogenic trypanosomatids. However, whether apoptosis-like mechanism occur with the participation of metacaspases and modulation by the presence of apoptotic Bcl-2 family regulators are yet to be elucidated [25]. The necrotic pathway is evidenced by the intense cytosolic vacuolization, strong effect on the mitochondrion, random DNA fragmentation and plasma membrane disruption [25]. In the present investigation, the mechanism of action of the novel peptides was evaluated on epimastigote forms by flow cytometry and scanning electron microscopy (SEM). Both techniques demonstrated membrane damage, where the 7AAD+/AX-population was two-fold higher for [Lys]³-M-PONTX-Dq3a [1–15] than for M-PONTX-Dq3a [1–15] treated epimastigotes and the same difference was observed for EC50.

It is important to note that AMPs from other animal venoms, such as batroxocidin [11] and crotalicidin [23] are also able to induce necrosis with a high SI. However, benznidazole-induced necrosis [26] has a weak SI.

Cationicity (positive net charge) is an important physicochemical feature of peptides, which influences peptide-membrane interactions by modulating the initial electrostatic interactions between AMPs and the negatively charged phospholipids present in the microorganism

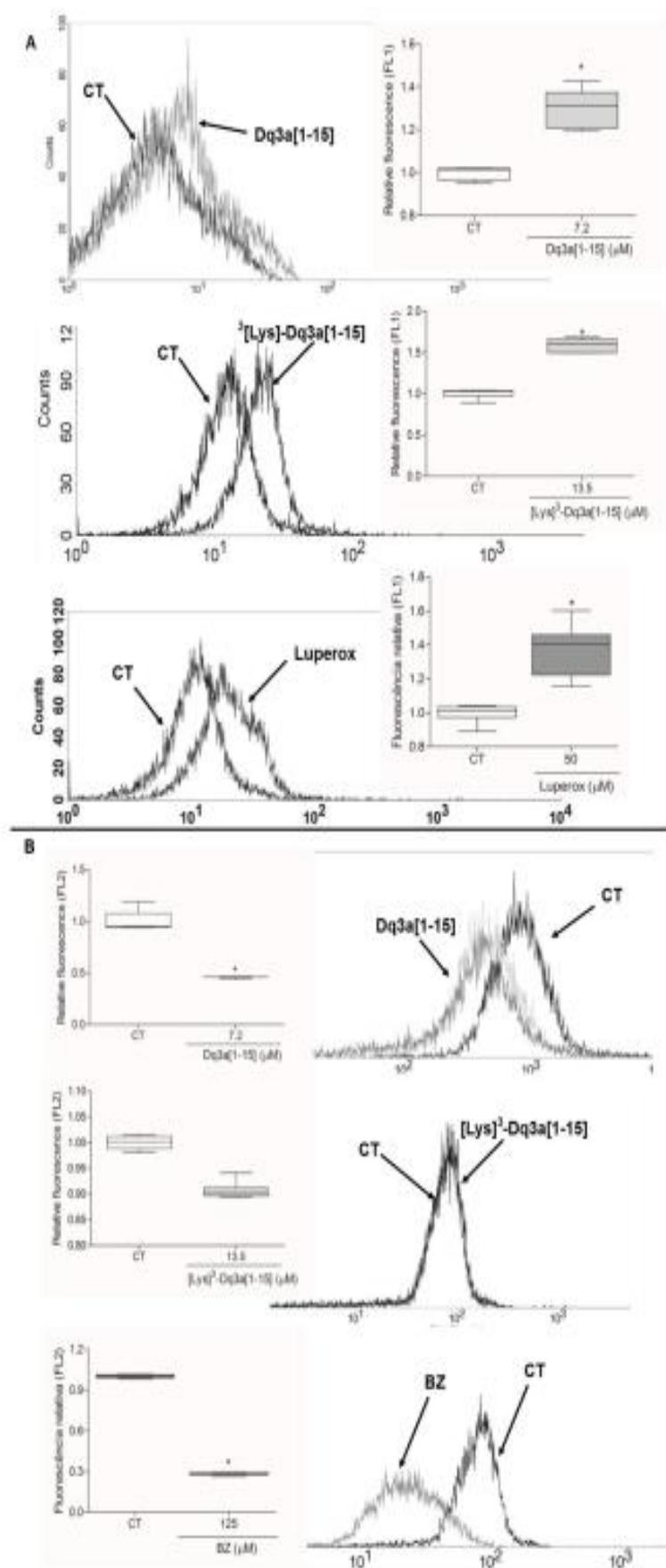


Fig. 3. Optimized trypanocidal peptides induce oxidative stress. Flow cytometry analysis of the formation of ROS in epimastigote forms treated with M-PONTX-Dq3a [1–15] at 7.2 μM , 2 [Lys]-M-PONTX-Dq3a [1–15] at 13.5 μM and luperox at 50 μM (A) and Rhodamine 123 labeling of epimastigote forms treated with M-PONTX-Dq3a [1–15] at 7.2 μM , 2 [Lys]-M-PONTX-Dq3a [1–15] at 13.5 μM and benzimidazole at 125 μM (B). (CT: control in PBS; Rho123: Rhodamine 123; BZ: benzimidazole).

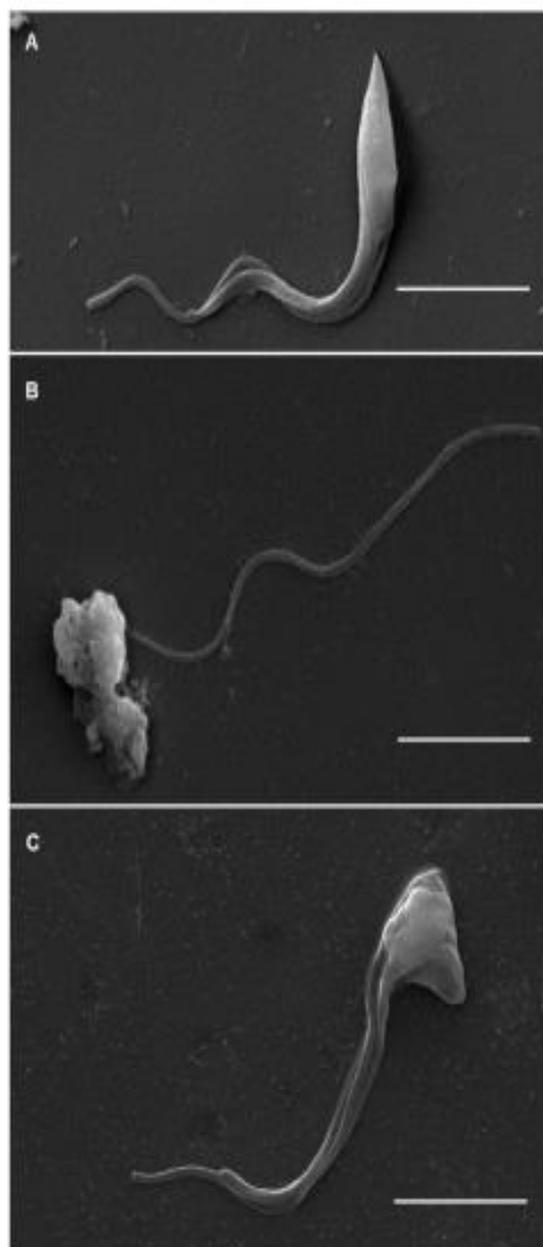


Fig. 4. The morphology of dying epimastigotes after trypanocidal peptide treatment. Scanning electron microscopy of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes treated with peptides. (A) Control epimastigotes, (B) treated with EC_{50} of M-PONTX-Dq3a [1–15], (C) treated with EC_{50} of [Lys]⁵-M-PONTX-Dq3a [1–15]. Scale bar: 5 μ m.

membranes [27]. The lysine-substituted analog [Lys]⁵M-PONTX-Dq3a [1–15] has a positive (+1) net charge, which not only increases the peptide selectivity but is probably responsible for the higher affinity for interaction with the *T. cruzi* membrane. Furthermore, differences in mitochondrial membrane interaction observed only for M-PONTX-Dq3a [1–15] could be also explained by the higher binding affinity of the lysine-substituted analog to the external membrane.

Altogether, we have rationally designed two novel M-PONTX-Dq3a short-derived peptides that retain the trypanocidal activity over the standard-of-care drug, while increasing peptide opportunities to reach the clinical use stage.

5. Conclusion

This study has demonstrated that the minimum M-PONTX-Dq3a derived peptide is able to induce the death of the different biological forms of *Trypanosoma cruzi* with better selectivity and activity than the current standard-of-care drug, benzimidazole.

Credit author statement

Marília Lopes Monteiro, Danya Bandeira Lima: Conceptualization, Methodology, Data curation, Writing- Original draft preparation. Katielle Albuquerque Freire, Emanuel Paula Magalhães, Brenna Pinheiro Silva, Alicia Belén García-Jareño, João Victor Serra Nunes, Marcia Machado Marinbo, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes: Methodology. Mar Orzaez, Vani Xavier Oliveira Junior, Alice Maria Costa Martins: Writing- Reviewing and Editing, Visualization, Investigation, Project administration Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Danya Bandeira Lima reports financial support was provided by Coordination of Higher Education Personnel Improvement. Vani Xavier Oliveira Junior reports financial support was provided by State of Sao Paulo Research Foundation. Alice Maria Costa Martins reports financial support was provided by National Council for Scientific and Technological Development. Mar Orzaez reports financial support was provided by European Regional Development Fund. Danya Bandeira Lima reports financial support was provided by Federal University of Ceara.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq-Process number 435426/2018-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES-PNPD 88887.368537/2019-00, Finance Code 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP-VXO #2017/03046-2), European Regional Development Fund (ERDF) included in the ERDF Operational Program of the Valencian Community 2014-2020 and the Generalitat Valenciana - Spain (PROMETEO/2019/065) for funding the study. We are also thankful to the Analytical Center Core Facility of the Federal University of Ceará for the technical support in the Electron Microscopy studies and the Multiuser Central Facilities (UFABC) for the experimental support.

References

- [1] World Health Organisation (WHO), Chagas disease (also known as American trypanosomiasis), 2021, April 1, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed March 21, 2022), [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)), 2020. (Accessed 4 March 2021).
- [2] J.A. Pérez-Molina, I. Molina, Chagas Disease, 2018, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- [3] G. Upret, A. Luther, D. Obrecht, P. Ernert, Emerging peptide antibiotics with therapeutic potential, *Med. Drug Discov.* 9 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.middis.2020.100079>.
- [4] C.H. Chen, Y.K. Lu, Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications, 9, *Antibiot.*, Basel, Switzerland, 2020, <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9010024>.
- [5] E.F. Sabiá Júnior, L.F.S. Menezes, L.F.S. de Araújo, E.F. Schwartz, Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against *Protoplasma* parasites, *Toxins* 11 (2019) 563, <https://doi.org/10.3390/toxins11050563>.

- [6] D.B. Lima, C.P. Mello, L.C.J. Bandeira, R.R.P.P.B. De Menezes, T.L. Sampain, C. B. Falcao, J.-E.E.R.L. Muelighem, G. Rádó-Baptista, A.M.C. Martins, The diopenationin peptides from the giant ant *Diopenona quadricornis* display in vitro antitrypanosomal activity, *Biol. Chem.* 399 (2018) 187–196, <https://doi.org/10.1515/bch-2017-0198>.
- [7] M.D.T. Torres, C.N. Pedron, J.A. da Silva Lima, P.I. da Silva, F.D. da Silva, V. X. Oliveira, Antimicrobial activity of leucine-substituted decanin analogs with lower hemolytic activity, *J. Pept. Sci.* 23 (2017) 818–823, <https://doi.org/10.1002/psc.3029>.
- [8] C.N. Pedron, M.D.T. Torres, J.A. da S. Lima, P.I. Silva, F.D. Silva, V.X. Oliveira, Novel designed VmCT1 analogs with increased antimicrobial activity, *Eur. J. Med. Chem.* 126 (2017) 456–463, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.040>.
- [9] K.A. Freire, M.D.T. Torres, D.B. Lima, M.L. Monteiro, R.R.P.P.B. Bezerra de Menezes, A.M.C. Martins, V.X. Oliveira, Wasp venom peptide as a new antichagasic agent, *Toxicol* 181 (2020) 71–78, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2020.04.099>.
- [10] T. Vanden Berghe, S. Grootjans, V. Gossens, Y. Dondelinger, D.V. Krysko, N. Takahashi, P. Vandenabeele, Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo, *Methods* 61 (2013) 117–129, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.02.011>.
- [11] C.P. Mello, D.B. Lima, Ramon Ribeiro Paula Bezerra de Menezes, L.C. J. Bandeira, L.D. Tossarolo, T.L. Sampain, C.B. Falcao, G. Rádó-Baptista, Alice Maria Costa Martins, Evaluation of the antichagasic activity of botrotoxinin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland, *Toxicol* 130 (2017) 56–62, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.02.031>.
- [12] S. Novak, A. Hudson, Innovative lead discovery strategies for tropical diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 941–953, <https://doi.org/10.1038/nrd2144>.
- [13] L.D. Tossarolo, R.R.P.P.B. de Menezes, C.P. Mello, D.B. Lima, E.P. Magalhães, E. M. Bezerra, F.A.M. Sales, L.L. Bezerra Neto, M. de F. Oliveira, R.P. Dos Santos, E. L. Albuquerque, V.N. Freire, A.M. Martins, Nanoencapsulation of benzimidazole in calcium carbonate increases its selectivity to *Trypanosoma cruzi*, *Parasitology* 145 (2018) 1191–1198, <https://doi.org/10.1017/S002182018000597>.
- [14] C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E.W. Hancock, G. Schneider, Designing antimicrobial peptides: form follows function, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2011) 37–51, <https://doi.org/10.1038/nrd2391>.
- [15] C.N. Pace, J.M. Schultz, A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins, *Biophys. J.* 75 (1998), [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(98\)77529-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(98)77529-0).
- [16] W.C. Wimley, K. Hristova, Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions, *J. Membr. Biol.* 239 (2011) 27–34, <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9543-0>.
- [17] K. Lahnar, Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 508–519, <https://doi.org/10.2174/1568026616666160713122404>.
- [18] C.N. Pedron, K.A. Freire, M.D.T. Torres, D.B. Lima, M.L. Monteiro, R.R.P.P.B. De Menezes, A.M.C. Martins, V.X. Oliveira, Arg-substituted VmCT1 analogs reveals promising candidates for the development of new antichagasic agent, *Parasitology* 147 (2020) 1810–1818, <https://doi.org/10.1017/S002182020001882>.
- [19] J.A. Urbina, R. Docampo, Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 495–501, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580960>. (Accessed 1 September 2017).
- [20] M.J. Morilla, E.L. Romero, Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis, *Nanomedicine* 10 (2015) 465–481, <https://doi.org/10.2217/nnm.14.185>.
- [21] A.M. Mejía-Jaramillo, G.J. Fernández, M. Manilla, R.S. Nichols, O. Triana-Chávez, *Trypanosoma cruzi* strains resistant to benzimidazole occurring in Colombia, *Biomedica* 32 (2012) 196–205, <https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000300007>.
- [22] S.M.F. Murta, A.J. Romanha, In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benzimidazole, *Parasitology* 116 (Pt 2) (1998) 165–171, <https://doi.org/10.1017/S0021820979012084>.
- [23] L.C.J. Bandeira, D. Bandeira-Lima, C.P. Mello, T.P. Pereira, R.R.P.P.B. De Menezes, T.L. Sampain, C.B. Falcao, G. Rádó-Baptista, Alice Maria Costa Martins, Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperidicin, found in *Crotalus durissus terrificus rattlesnake's* venom gland, *Parasitology* 145 (2017) 1059–1064, <https://doi.org/10.1017/S002182017001846>.
- [24] A. Vela, M. Coral-Almeida Id, D. Soranzo Id, J.A. Costales Id, C.B. Id, S. Frei De, Biqua Brenonid, In Vitro Susceptibility of *Trypanosoma Cruzii* Diacritic Typing Units (DTUs) to Benzimidazole: A Systematic Review and Meta-Analysis, 2021, <https://doi.org/10.1571/journal.pntd.0009269>.
- [25] R.F.S. Meza-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill, *Cell Death Dis.* 10 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1376-2>.
- [26] L.C.J. Bandeira, D. Bandeira-Lima, C.P. Mello, T.P. Pereira, R.R.P.P.B. De Menezes, T.L. Sampain, C.B. Falcao, G. Rádó-Baptista, A.M.C. Martins, Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperidicin, found in *Crotalus durissus terrificus rattlesnake's* venom gland, *Parasitology* (2017), <https://doi.org/10.1017/S002182017001846>.
- [27] C.N. Pedron, C.S. de Oliveira, A.F. da Silva, G.P. Andrade, M.A. da Silva Pinhal, G. Cerchiaro, P.I. da Silva Junior, F.D. da Silva, M.D.T. Torres, V.X. Oliveira, The effect of lysine substitutions in the biological activities of the scorpion venom peptide VmCT1, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 136 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.06.006>.

