



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

STEPHANIE ALVES VELOSO

**EFEITO TRIPANOCIDA DO ANÁLOGO [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] DA
DINOPONERATOXINA M-PONTX-Dq3a [1-15] E AÇÃO SOBRE A ENZIMA
GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE**

FORTALEZA

2022

STEPHANIE ALVES VELOSO

EFEITO TRIPANOCIDA DO ANÁLOGO [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] DA
DINOPONERATOXINA M-PONTX-Dq3a [1-15] E AÇÃO SOBRE A ENZIMA
GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alice Maria Costa Martins Nunes.

Coorientador: Me. Emanuel Paula Magalhães.

FORTALEZA

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)

V555e Veloso, Stephanie Alves.

Efeito tripanocida do análogo [ARG]4 M-PONTX-DQ3A [1-15] da Dinoponeratoxina M-PONTX-DQ3A [1-15] e ação sobre a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase / Stephanie Alves Veloso. – 2022. 47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profª. Dra. Alice Maria Costa Martins.

Coorientação: Me. Emanuel Paula Magalhães.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. peptídeos antimicrobianos. 4. dinoponeratoxinas. 5. TcGAPDH. I. Título.

CDD 615

STEPHANIE ALVES VELOSO

EFEITO TRIPANOCIDA DO ANÁLOGO [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] DA
DINOPONERATOXINA M-PONTX-Dq3a [1-15] E AÇÃO SOBRE A ENZIMA
GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
da Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Farmacêutico

Aprovada em: 07 / 12 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Farmacêutica Brenna Pinheiro Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por todas as benções até aqui. Aos meus pais, irmã e namorado, por todo apoio incondicional, como também a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ter me iluminado até aqui. Pedi tanto A Ele uma chance de ingressar no curso de Farmácia-UFC! E aqui estou eu, finalizando essa etapa tão importante na minha vida... e já pedindo para Ele abençoar outros sonhos. Obrigada, Senhor!

Só tenho a agradecer pelo incrível suporte que é a minha família. Aos meus maravilhosos pais, **Regiane** e **Edglê**, por toda dedicação, carinho, ensinamentos e amor. A minha linda irmã, **Heloisa**, por ser minha melhor amiga em todas as horas. Não há palavras para definir o meu amor por vocês.

Ao meu namorado, **Igor**, que esteve comigo em todos os momentos dessa jornada, dos mais leves aos difíceis de suportar sozinha, sempre me incentivando a seguir em frente. Obrigada por tudo, meu amor. Que sigamos juntos sempre!

À **Liga Acadêmica de Análises Clínicas** (LAAC – UFC), por todo conhecimento adquirido e pelas lindas amizades que formei. **Clarice**, **Igor** (o mesmo), **Isabelle**, **Lívia** (Livinha), **Luana**, **Raissa**, **Samylia** e **Thais**, vocês são incríveis! Tenho muito orgulho das pessoas que são e dos futuros profissionais que serão. Aos que permanecem na LAAC, por dar continuidade a esse projeto tão lindo, principalmente ao **Leones** e ao **Guilherme**, amigos com quem sempre posso contar.

Ao **Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica** (LBFBC), por todos os ensinamentos. Com certeza me ajudou a saber o tipo de profissional que quero ser. À professora **Alice Martins**, por ter me dado a oportunidade de entrar no mundo da pesquisa científica. E em especial, a **Brenna**, que me acolheu com todo carinho e que jamais vou esquecer. Uma amizade que quero levar para o resto da vida. Além de todos que fazem parte do grupo LBFBC, seja por uma ajuda em experimentos ou por momentos de muitas risadas, foram todos essenciais para mim.

À **Universidade Federal do Ceará** (UFC), por ter me proporcionado mais de cinco anos de tantas emoções, aprendizados e experiências.

A todos que me ajudaram a trilhar esse caminho. Não conseguiria chegar até aqui sem vocês. Esse trabalho tem um pouquinho de cada um.

E que comece mais um sonho!

"São as nossas escolhas, mais que nossas capacidades, que mostram quem realmente somos."

- **Alvo Dumbledore.**

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é um problema de saúde pública negligenciado mundialmente, a qual contém como única opção de tratamento no Brasil, o benznidazol (BZN), medicamento que apresenta efetividade limitada e efeitos adversos importantes. Nesse contexto, há necessidade de buscar estratégias terapêuticas que promovam uma maior seletividade sobre o parasito sem causar complicações para o hospedeiro. O veneno da formiga gigante *Dinoponera quadriceps* é rico em peptídeos, denominados dinoponeratoxinas (Dntxs), classificados como peptídeos antimicrobianos (PAMs). Em estudos anteriores, a Dntx M-PONTX-Dq3a apresentou efeito tripanocida nas principais formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*, sendo então considerado promissor. Seu fragmento, a Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15], demonstrou efeito muito semelhante ao peptídeo parental, além de um tamanho menor, implicando em custos reduzidos de produção. Apesar disso, a possibilidade de melhoria na atividade da M-PONTX-Dq3a [1-15] levou a criação de vários análogos, sendo um deles o análogo [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15] abordado neste estudo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito tripanocida do análogo [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15], e sua ação sobre a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), importante para a sobrevivência do parasito. Para isso, foram realizados ensaios nas formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Em formas tripomastigotas, foi observado que o análogo [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou IC₅₀ 1,09 µM, sendo seu efeito 148 vezes maior que o benznidazol. Nos estudos de docking molecular, o peptídeo em estudo apresentou interação favorável com a enzima TcGAPDH, principalmente nas regiões dos resíduos Thr167, Cys166 e Ile13. Para isso, foi feita a avaliação da atividade tripanocida nas formas epimastigotas para determinação das concentrações utilizadas na dosagem da atividade enzimática, sendo obtida a IC₅₀ >19,2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A avaliação da atividade enzimática foi realizada nas concentrações de 19,2; 9,6 e 4,8 µM, nos tempos de 2 horas, 1 hora, 30 minutos e 15 minutos respectivamente, não havendo diferença significativa entre os tempos e concentrações testadas, mas com redução da atividade enzimática. Em conclusão, o análogo [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15] apresenta um grande potencial, pois apresenta efeitos sobre a forma infectante do *T. cruzi*, reduzindo a atividade da TcGAPDH, importante alvo farmacológico para a doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; peptídeos antimicrobianos; dinoponeratoxinas; TcGAPDH.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a neglected public health problem worldwide, which contains benznidazole (BZN) as the only treatment option in Brazil, a drug that has limited effectiveness and significant adverse effects. In this context, there is a need to seek therapeutic strategies that promote greater selectivity on the parasite without causing complications for the host. The venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* is rich in peptides called dinoponeratoxins (Dntxs), classified as antimicrobial peptides (AMPs). In previous studies, Dntx M-PONTX Dq3a showed a trypanocidal effect on the main evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi*, and was therefore considered promising. Its fragment, Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15], demonstrated an effect very similar to the parent peptide, in addition to a smaller size, implying reduced production costs. Despite this, the possibility of improving the activity of M-PONTX-Dq3a [1-15] led to the creation of several analogues, one of which is the analogue [Arg]4-M-PONTX-Dq3a [1-15] addressed in this study. Thus, the objective of this work was to evaluate the trypanocidal effect of the analog [Arg]4-M-PONTX-Dq3a [1-15], and its action on the enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH), important for the survival of the parasite. For this, tests were carried out on the trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi*. In trypomastigotes, the analogue [Arg]4-M-PONTX Dq3a [1-15] was observed to have an IC₅₀ of 1.09 μM, with an effect 148 times greater than that of benznidazole. In molecular docking studies, the peptide under study showed a favorable interaction with the TcGAPDH enzyme, mainly in the regions of residues Thr167, Cys166 and Ile13. For this, the evaluation of the trypanocidal activity in the epimastigotes forms was carried out to determine the concentrations used in the dosage of the enzymatic activity, obtaining an IC₅₀ >19.2 at 24, 48 and 72 hours. The evaluation of enzymatic activity was performed at concentrations of 19.2; 9.6 and 4.8 μM, at 2 hours, 1 hour, 30 minutes and 15 minutes, respectively, with no significant difference between the times and concentrations tested, but with a reduction in enzymatic activity. In conclusion, the analogue [Arg]4-M-PONTX-Dq3a [1-15] has great potential, as it has effects on the infective form of *T. cruzi*, reducing the activity of TcGAPDH, an important pharmacological target for the disease of *Nasturtium*.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; antimicrobial peptides; dinoponeratoxins; TcGAPDH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países endêmicos e não endêmicos a doença de Chagas	16
Figura 2 – Óbitos no período de 1996 a 2016 por DC no Brasil e no Nordeste	17
Figura 3 - Principais formas de sobrevivência do <i>T. cruzi</i>	19
Figura 4 - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	20
Figura 5 - Estrutura química do BZN e NFX	21
Figura 6 – <i>D. quadriceps</i>	23
Figura 7 - Esquema experimental do cultivo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	28
Figura 8 - Esquema experimental da avaliação da viabilidade celular das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 9 - Esquema experimental da avaliação da viabilidade celular das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 10 - Esquema experimental do ensaio enzimático da TcGAPDH	31
Figura 11 - Efeito tripanocida da [Arg] ⁴ -M-PONTX-Dq3a [1-15] em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	33
Figura 12 - Complexo [Arg] ⁴ -M-PONTX-Dq3a [1-15] /TcGAPDH	34
Figura 13 - Curva enzimática da TcGAPDH	35
Figura 14 – Redução da atividade da enzima TcGAPDH	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dinoponeratoxinas e suas sequências primárias de aminoácidos.....	27
Tabela 2 - Efeito tripanocida e IS da DnTx M-PONTX-Dq3a [1-15] e o análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] em formas tripomastigotas.....	32
Tabela 3 - Efeito da DnTx M-PONTX-Dq3a [1-15] e do análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] em formas epimastigotas.....	33
Tabela 4 - Distâncias (Å) de interações entre o peptídeo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] e resíduos do sítio catalítico da TcGAPDH.....	34
Tabela 5 - Atividade enzimática em <i>T. cruzi</i> após tratamento com [Arg] ⁴ -M-PONTX-Dq3a [1-15].....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-BPG	1,3-Bisfosfoglicerato
aa	Aminoácidos
ATP	Adenosina trifosfato
BZN	Benznidazol
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DCC	Doença de Chagas Crônica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DnTxs	Dinoponeratoxinas
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
E.P.M.	Erro padrão da média
G3P	3-gliceraldeído-3-fosfato
IC50	Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitos
IS	Índice de seletividade
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NFX	Nifurtimox
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
Pi	Fosfato inorgânico
SBF	Soro Bovino Fetal
TcGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	DC e sua epidemiologia	16
2.2	Vias de transmissão	17
2.3	Manifestações clínicas da doença de Chagas	18
2.4	Ciclo de biológico e morfologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.5	Tratamento farmacológico da DC	21
2.6	Estudo <i>in silico</i>	22
2.7	Novos alvos farmacológicos para o tratamento da DC	22
2.7.1	<i>Via glicolítica</i>	22
2.8	Potencial terapêutico das dinoponeratoxinas	23
2.9	Justificativa	25
3	OBJETIVO	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Substância em estudo	27
4.2	Cultivo celular de células hospedeiras	27
4.3	Avaliação do efeito tripanocida do análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre as formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i>	28
4.4	Avaliação do efeito do análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre as formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>	29
4.5	Estudos de docking molecular	30
4.6	Efeito do análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a atividade enzimática de TcGAPDH	30
4.7	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Avaliação do efeito tripanocida do análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] nas formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	32
5.2	Avaliação do efeito tripanocida do análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	32
5.3	Docking Molecular	34
5.4	Avaliação do efeito análogo [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a atividade enzimática de TcGAPDH	35
6	DISCUSSÃO	37

7

CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é um problema de saúde pública que atinge, principalmente, a população de países tropicais, sobretudo os da América Latina. Entretanto, com a globalização, países da Europa, América do Norte, Austrália, Japão, dentre outros 21 países possuem indivíduos portadores desta enfermidade (CHATELAIN et al., 2017).

O agente etiológico da DC é o *Trypanosoma cruzi*, que pode ser transmitido, através dos insetos triatomíneos infectados, durante o seu repasto sanguíneo; por via oral, ao ingerir alimentos contaminados pelo parasito; via transplantes e transfusões sanguíneas; e por via congênita (NEVES, 2004).

O único tratamento disponível no Brasil é o benznidazol, que possui eficácia limitada na fase crônica da doença e é capaz de causar reações adversas que afetam a adesão do paciente (DNDi, 2021). Dessa forma, é de suma importância a pesquisa e o desenvolvimento de novas moléculas que sejam efetivas no contexto da DC.

Atualmente, a investigação e elucidação de rotas bioquímicas e moléculas específicas do parasito vem recebendo bastante atenção no desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. Dentre muitas, a via glicolítica de síntese de ATP (adenosina trifosfato) pelo *T. cruzi*, bem como a sua principal enzima, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), vem ganhando destaque como alvo molecular nesse tipo de pesquisa. (VINHOTE et al., 2017).

Dentro da pesquisa farmacológica, venenos de origem animal vêm sendo estudados como fonte e modelos para novas moléculas no tratamento de doenças, visto que são compostos ricos em peptídeos cujos efeitos biológicos, como antimicrobiano, antifúngico, leishmanicida e tripanocida são bastante conhecidos (CHATELAIN et al., 2017). Pensando nisso, foi estudada a ação do veneno total da formiga *Dinoponera quadriceps* (DqV) contra as principais formas de sobrevivência da cepa Y de *T. cruzi*, parcialmente resistente ao benznidazol, demonstrando uma alta seletividade pelo parasito.

Através de estudos proteômicos, foram identificados uma série de peptídeos antimicrobianos presentes na DqV, os quais são denominados como dinoponeratoxinas (Dntx) Dq-3348, Dq-2561, Dq-1503 e Dq-1319 (COLOGNA et al., 2013; TORRES et al., 2014).

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 quais foram denominadas de acordo com seu peso molecular teórico ou experimental e por uma nomenclatura normalizada: Dq2561 (M-PONTXDq3a; 23 resíduos de aminoácidos), Dq-1503 (M-PONTXDq3b; 13 resíduos de aminoácidos), Dq-1319 (M-PONTX-Dq3c, 11 resíduos de

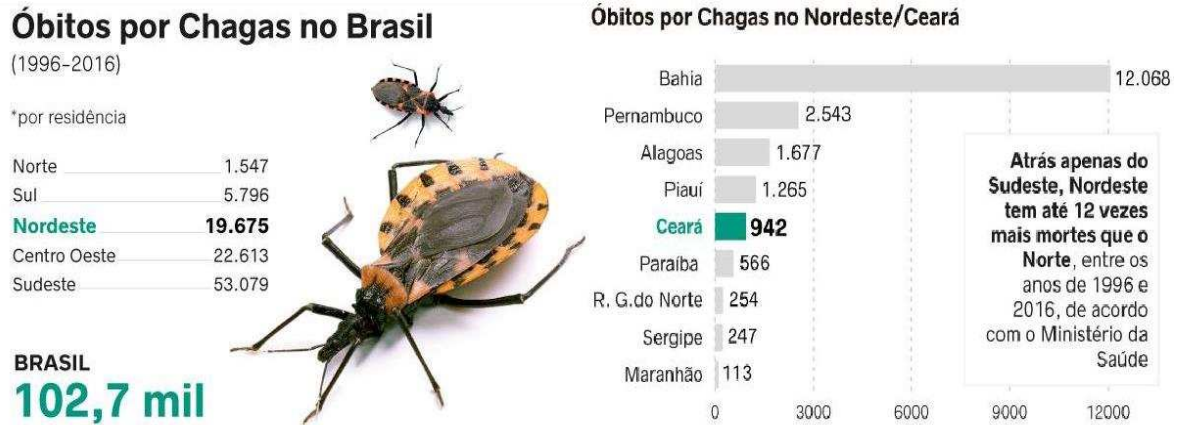
aminoácidos) e Dq-3348 (MPONTX- Dq4e; 30 resíduos de aminoácidos). Dentre os diferentes PAMs com atividade antichagásica, M-PONTX-Dq3a foi identificado como um peptídeo promissor contra as principais formas evolutivas de *T. cruzi*, possuindo, assim, o maior índice de seletividade (IS) (BANDEIRA LIMA *et al.*, 2017).

Entretanto, o uso de peptídeos de ocorrência natural como agentes terapêuticos tem limitações que precisam ser superadas, como falta de estabilidade, toxicidades potenciais, e seu tamanho relativamente grande (> 20 aminoácidos), o que aumenta os custos gerais de produção e fabricação, limitando o potencial uso dessas moléculas na terapêutica (BANDEIRA LIMA *et al.*, 2018).

Para contornar esses problemas, reduzir custos de obtenção e potencializar as atividades biológicas das Dntx, foram empregadas estratégias de otimização estrutural desses compostos. Dessa forma, foram desenvolvidos os derivados da M-PONTX-Dq3a, a M-PONTX-Dq3a [1-15] e a M-PONTX-Dq3a [3-15]. Em estudos realizados para avaliação dos efeitos desses dois derivados, observou-se um melhor efeito do peptídeo M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre as formas de *T. cruzi* (SILVA, 2021), o qual foi escolhido para a síntese de análogos que foram utilizados no presente trabalho (MONTEIRO, 2022).

Jaguaribe (mortalidade de 2,3/100.000 habitantes - 63 óbitos), Cariri (mortalidade de 1,4/100.000 habitantes – 101 óbitos) e Sertão Central (mortalidade 0,8/100.000 habitantes – 25 óbitos) são as regiões do estado com maior mortalidade por DC (CEARÁ, 2021).

Figura 2: Óbitos no período de 1996 a 2016 por DC no Brasil e no Nordeste.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS/CGIAE – Sistema de Informações sobre Mortalidade (Diário do Nordeste). Disponível em: <<https://diariodonordeste.verdesmares.com.br/metro/negligenciada-doenca-de-chagas-mata-um-por-semana-no-ceara-1.2038492>>. Acesso em 12 de novembro, 2022.

2.2 Vias de transmissão

As principais vias de transmissão do *T. cruzi* conhecidas são a vetorial, congênita, por transfusão sanguínea ou transplantes de órgãos e a por ingestão de alimentos contaminados (NEVES, 2004).

A forma vetorial, com período de incubação de 4 a 15 dias, ocorre durante o repasto sanguíneo do inseto triatomíneo (“barbeiro”) infectado, que libera as fezes contendo formas infectantes do parasito ao lado da lesão feita pela picada. Ao coçar a região, o indivíduo promove a entrada dos parasitos na corrente sanguínea (GONTIJO SANTOS, 2011).

A transmissão congênita ou via placentária pode ocorrer em qualquer fase da gestação ou parto, pelo contato do sangue infectado da mãe com as mucosas do feto. Entretanto, o maior risco ocorre nos últimos 3 meses de gestação, já que a mãe tem aumento da parasitemia (REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015). Também pode acontecer a transmissão pela deposição do parasito na placenta, que são liberados para a circulação fetal, podendo causar morte prematura do feto (NEVES et al., 2004).

A transmissão por via transfusional, mesmo sendo pouco frequente, ainda não foi totalmente extinta, já que todo componente hemoterápico é potencialmente infectante. O *T. cruzi* pode permanecer viável a 4°C por 18 dias, ou em temperatura ambiente por 250 dias em

bolsas de sangue (DIAS, 2006). Para se evitar esse tipo de transmissão da DC, todos os hemocentros do Brasil devem realizar o teste de sorologia para o *T. cruzi*, antes de o material ser liberado para doação.

A transmissão por transplante de órgãos infectados pode desencadear a forma aguda grave, já que o paciente faz uso de imunossupressores, favorecendo o aumento da infecção (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

A transmissão oral vem aumentando muito nos últimos tempos, principalmente na região norte do Brasil, ocorrendo pelo consumo de alimentos contaminados com as fezes de triatomíneo infectado, como caldo de cana e açaí (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011).

2.3 Manifestações clínicas da doença de Chagas

A clínica da DC apresenta-se de duas formas: a fase aguda (DCA) (sintomática ou assintomática) e a fase crônica (DCC), que pode ser classificada como indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva, a depender das regiões do corpo afetadas (BRASIL, 2021).

A fase aguda tem como característica a alta parasitemia, apresentando sintomas de febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e edema subcutâneo (inespecíficos) nas 4 ou 6 primeiras semanas após a infecção, ou podem apresentar-se de forma assintomática. Características clássicas de infecção podem ser encontradas nessa fase, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romanã (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Cerca de 20 a 30% das pessoas que estão com DCA evoluem para DCC (PEREIRA; NAVARRO, 2013). A fase crônica também pode ser classificada em assintomática, chamada de indeterminada, e sintomática, que pode ser classificada de acordo com o órgão(s) mais afetado(s) pela DC, chamadas de cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Na forma indeterminada, o paciente possui nenhuma sintomatologia da doença, podendo levar de 10 a 20 anos para que comece a manifestá-la. Na fase sintomática, a forma cardíaca é a que mais afeta os indivíduos com DCC, apresentando complicações no sistema cardiovascular como a miocardiopatia (MORAES; SILVA, 2011). Na forma digestiva, é possível encontrar várias lesões nos plexos intramurais, devido a deposição de parasitos nesse tipo de tecido, gerando inflamação, que pode levar a formação do megacólon e do megaesôfago (ALEXANDRE *et al.*, 2014). A forma cardiodigestiva apresenta os dois tipos de sintomas, sendo de maior risco para o paciente.

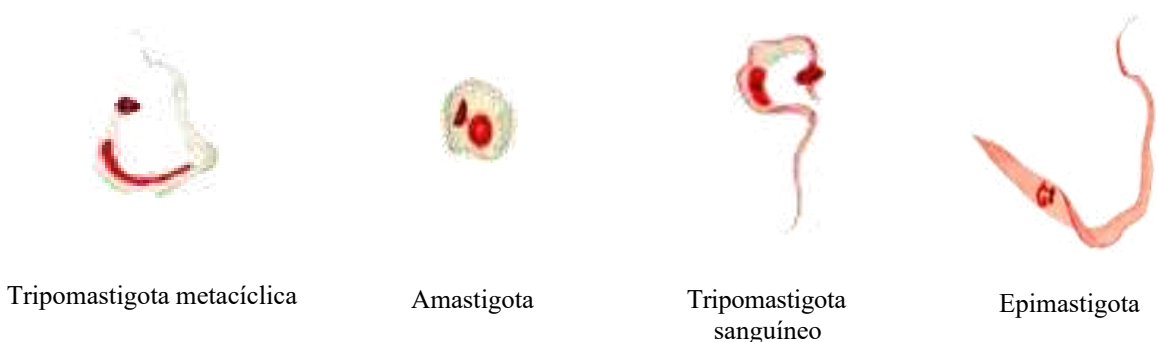
2.4 Ciclo biológico e morfologia do *Trypanosoma cruzi*

Segundo a classificação taxonômica da Sociedade Internacional de Parasitologia, o *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao subgrupo Excavata, divisão Euglenoza e subdivisão Kinetoplasta (ADL et al., 2005). É um parasito obrigatório dos insetos hematófagos da família *Reduviidae* - triatomíneos -, de seres humanos e até pequenos mamíferos (FIOCRUZ, 2020). Possui três principais formas de sobrevivência e, a depender de seu hospedeiro e fase clínica da DC, pode ser encontrado em forma e locais diferentes no organismo (NEVES, 2004).

O ciclo biológico do *T. cruzi* necessita da passagem obrigatória pelo inseto vetor, o triatomíneo, para que haja a multiplicação extracelular do parasito, podendo seguir para o segundo hospedeiro, o vertebrado, onde o parasito realiza sua multiplicação intracelular (FRANCISCO et al., 2017).

As três principais formas do *T. cruzi*, que podem ser vistas na figura 3, são as formas epimastigotas, proliferativa extracelular e não infectante, que se encontra no intestino do triatomíneo infectado; tripomastigota, não proliferativa e infectante, que se encontra no intestino inferior e nas dos triatomíneos, na corrente sanguínea dos humanos e em pequenos mamíferos infectados; e a forma amastigota, proliferativa intracelular não infectante, que se encontra somente no hospedeiro definitivo (MENEZES, 2017).

Figura 3 – Principais formas de sobrevivência do *T. cruzi*.



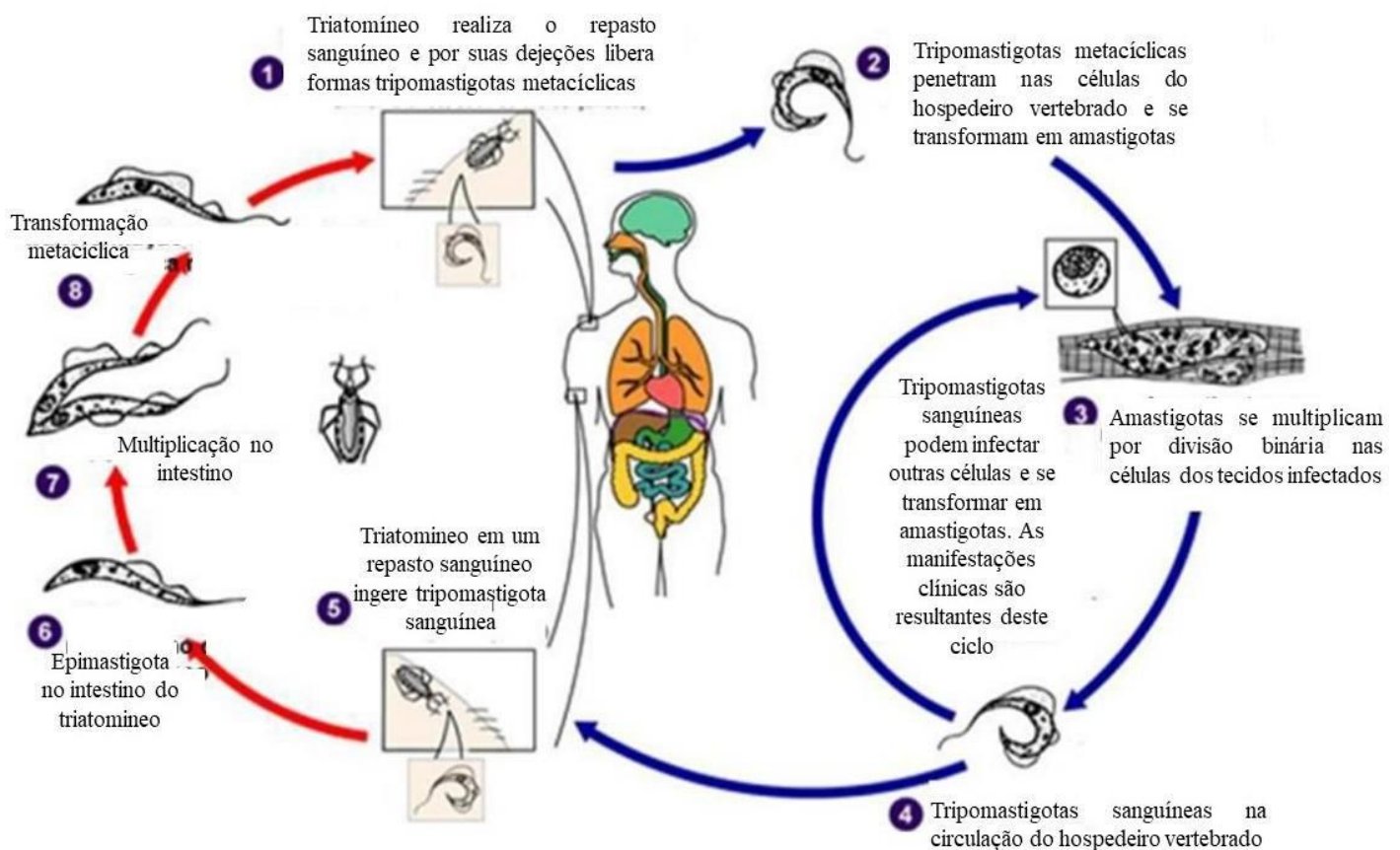
Fonte: VIEIRA, 2017. Disponível em:

https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/25153/jose_vieira_ioc_mest_2017.pdf;jsessionid=475920C43CA1B77A45B7820C0CF8A7EB?sequence=2. Acesso em 13 de novembro, 2022

O ciclo do *T. cruzi* se inicia com o repasto sanguíneo do triatomíneo (“barbeiro”) infectado no hospedeiro vertebrado, onde ele realiza a picada para iniciar o repasto e deposita

sobre o hospedeiro fezes contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas. Ao coçar a pele, o ser vertebrado faz com que os tripomastigotas presentes nas fezes entrem pelo inóculo da picada do inseto, pelas mucosas ou até mesmo por ferimentos presentes na pele. Ao chegar à corrente sanguínea, as formas tripomastigotas penetram nas células e se diferenciam para a forma amastigota, para realizar o processo de multiplicação intracelular. Após a célula infectada possuir inúmeras formas amastigotas, ocorre a diferenciação para formas tripomastigotas, que causam o rompimento da célula, e são liberadas para a corrente sanguínea, infectando novas células. Em seguida, um triatomíneo não infectado realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado infectado, ingerindo as formas infectantes do parasito, que se diferenciam em epimastigotas no intestino médio anterior do barbeiro. Após isso, as formas epimastigotas se multiplicam e se transformam em tripomastigotas metacíclicas infecciosas, que são liberadas nas fezes do triatomíneo durante seu repasto sanguíneo (NEVES, 2004; MENEZES, 2017). O ciclo pode ser visto na figura 4.

Figura 4 - Ciclo biológico do *T. cruzi*.



Fonte: VIEIRA, 2017. Disponível em:

https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/25153/jose_vieira_ioc_mest_2017.pdf;jsessionid=475920C43CA1B77A45B7820C0CF8A7EB?sequence=2. Acesso em 13 de novembro, 2022.

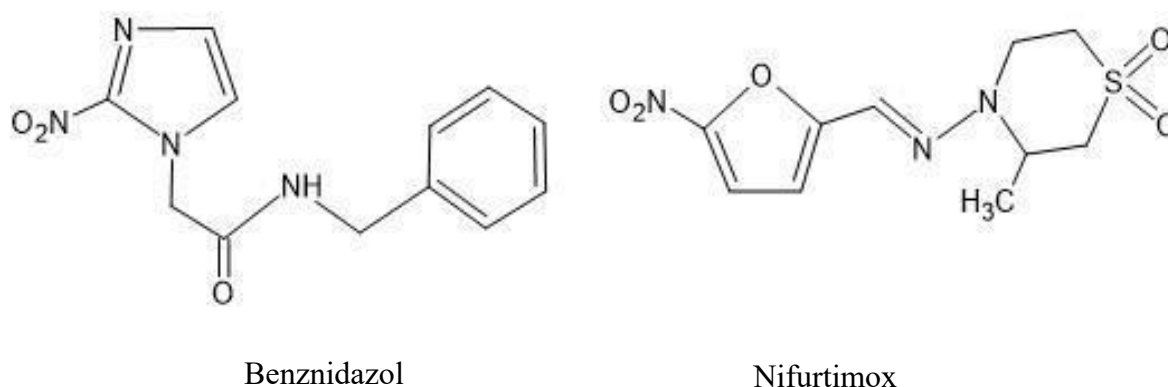
2.5 Tratamento farmacológico da DC

Desde a descoberta da DC, em 1909 pelo médico sanitário Carlos Chagas, só foram desenvolvidos dois fármacos para o tratamento da DC, o nifurtimox (NFX) e o benznidazol (BZN), sendo este último o único disponível para uso (DIAS *et al.*, 2009). Esses medicamentos são ou foram utilizados com a expectativa de redução da parasitemia e inibição da evolução da doença e diminuição das complicações da fase crônica, aumentando a qualidade e expectativa de vida do paciente. Entretanto, esses dois fármacos possuem baixa eficácia de cura na fase crônica da doença, cerca de 40% (LEITE, 2019). O NFX deixou de ser utilizado como tratamento no Brasil e em muitos países do mundo devido a sua toxicidade (MENEZES, 2017).

O fármaco utilizado atualmente para o tratamento no país, recomendado pelo Ministério da Saúde, é o BZN. Porém, possui eficácia bastante limitada na fase crônica da DC, além de apresentar muitos efeitos adversos como dermatite atópica, febre, perda de peso e distúrbios gastrointestinais a curto prazo e trombocitopenia, leucopenia e distúrbios neurológicos a longo prazo do tratamento, o que desestimula a continuação do tratamento pelo paciente (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; MENEZES, 2017). Além disso, não é recomendado o uso por pacientes com insuficiência renal, insuficiência hepática e gestantes (MONTEIRO, 2022).

Ademais, por ser uma doença que afeta, sobretudo, pessoas de países subdesenvolvidos, a falta de interesse da indústria farmacêutica em buscar novos compostos antichagásicos reforça a importância de grupos de pesquisa em todo o mundo de realizarem estudos que conheçam melhor a biologia do parasito, bem como desenvolverem novas moléculas com potencial tripanocida (DNDi, 2021).

Figura 5 – Estrutura química do BZN e NFX.



Fonte: adaptado de FIOCRUZ, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em 12 de novembro, 2022.

2.6 Estudo *in silico*

O *screening* ou triagem experimental de grandes quantidades de moléculas consome tempo, recursos e requer intenso trabalho laboratorial para os ensaios confirmatórios. Com isso, as técnicas de *screening* virtual têm sido utilizadas para otimizar, acelerar e reduzir os custos associados ao processo de desenvolvimento de novos (SANTOS; FERREIRA, 2022). Dentre essas estratégias, estudos *in silico* de docagem molecular têm sido amplamente utilizados, já que estes são capazes de prever a ocorrência de interações entre as novas moléculas e o alvo proteico, otimizando o processo de *screening* farmacológico. Contudo, essas atividades só podem ser confirmadas por meio de estudos experimentais (PINZI; RASTELLI, 2019).

Para os estudos de docking molecular é necessário que se conheça a estrutura tridimensional do alvo, geralmente proteico, comumente obtida por cristalografia de raios X e disponibilizada em bancos de dados. Em torno dessa estrutura, é determinado um *grid*, o espaço que delimita sítios de interesse para análise da interação com um ligante. Então, as conformações ou orientações do ligante na interação com o receptor são calculadas por *software* através de algoritmos com base na energia de ligação entre as moléculas. Quanto mais estável a conformação e o complexo formado, maior será a energia liberada pela ligação e mais termodinamicamente favorável será a interação (BATISTA *et al.*, 2022; PINZI; RASTELLI, 2019).

2.7 Novos alvos farmacológicos para o tratamento da DC

Dentre as muitas estratégias para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial tripanocida, estudos que visam conhecer e evidenciar as principais rotas bioquímicas do *T. cruzi*, sobretudo aquelas que são diferentes das vias do hospedeiro definitivo, são alvos de maior interesse, já que possibilitam a descoberta de terapias mais seletivas para o parasito, e menos tóxicas para o ser humano (MENEZES, 2017; FIOCRUZ, 2017).

2.7.1 Via glicolítica

A via glicolítica, responsável por metabolizar a glicose, no *T. cruzi*, é a sua principal via de obtenção de energia. Sua grande dependência faz com que seja um bom alvo para a pesquisa de novos fármacos. As enzimas que participam dessa via possuem uma organização específica e características estruturais particulares, diferentes daquelas proteínas presentes em mamíferos, o que reforça seu estudo (PROKOPCZYK, 2012). Uma dessas enzimas é a gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), que exerce um importante papel para a manutenção da via glicolítica.

A TcGAPDH (sexta enzima da via glicolítica), catalisa a fosforilação oxidativa do 3-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG), com consumo de NAD^+ (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada) e P_i (fosfato inorgânico). Quando ocorre inibição dessa enzima, o parasito perde a sua produção de ATP, desencadeando processo de morte celular (PROKOPCZYK, 2012; MENEZES *et al.*, 2019). Dessa forma, devido à sua importância na manutenção da homeostasia e sobrevivência do parasito, a TcGAPDH é um alvo que vem sendo amplamente estudado na pesquisa de novas substâncias tripanocidas (FREIRE *et al.*, 2020).

2.8 Potencial terapêutico das dinoponeratoxinas

As biotoxinas, presentes em venenos de animais, têm sido estudadas amplamente pela indústria farmacêutica para a pesquisa de novas moléculas farmacologicamente ativas a (HARVEY, 2014). Dentre essas biotoxinas, destacam-se os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que são proteínas de origem vegetal ou animal produzidas pelo organismo como mecanismo de defesa contra outras espécies. Como característica, os PAMs possuem menos de 60 resíduos de aminoácidos (aa), natureza catiônica e anfipática, o que permite que haja uma alta permeabilidade do mesmo através das membranas lipídicas dos microrganismos (TORRENT *et al.*, 2013). Devido a isso, os PAMs podem ser facilmente modificados para melhorar suas características como estabilidade e seletividade (SILVA, 2021; MONTEIRO, 2022).

Dentre os muitos estudos de atividade biológica utilizando os PAMs, alguns tomam como base os venenos de artrópode, como o da formiga *D. quadriceps* (figura 6) (LIMA, 2018).

Figura 6: *D. quadriceps*.



Fonte: Flickr, 2015. Disponível em:

<<https://www.flickr.com/photos/69309308@N07/19310024640/in/photostream/>>. Acesso em 12 de novembro, 2022.

A *D. quadriceps*, também conhecida como “formiga gigante”, é pertencente a subfamília Poneriane e pode ser encontrada por todo o nordeste brasileiro (PAIVA; BRANDÃO, 1995). Seu veneno total possui efeitos antinociceptivo, anticonvulsivante, antimicrobiano e antiparasitário (SILVA, 2021).

Em trabalhos anteriores, foi realizada a análise do transcriptoma da glândula de veneno de *D. quadriceps*, evidenciando a presença de um grupo de proteínas, semelhante aos peptídeos antimicrobianos (PAMs), que foi chamado de dinoponeratoxinas (Dntxs) (TORRES et al., 2014).

Dentre a diversidade de Dntxs, foram evidenciados os peptídeos Dq-3348, Dq-2561, Dq-1503 e Dq-1319. Para cada peptídeo encontrado, foram avaliadas as suas propriedades tripanocidas, sendo o peptídeo Dq-2561, nomeado M-PONTX-Dq3a, o mais promissor, com índice de seletividade acima de 80, sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y (LIMA et al., 2018).

Entretanto, existem algumas limitações que dificultam o uso de PAMs como agentes terapêuticos, como falta de estabilidade, toxicidades potenciais, e seu tamanho relativamente grande (> 20 aa), o que aumenta os custos gerais de produção e fabricação. Nesse sentido, estudos computacionais e de design racional tem sido estratégias empregadas para otimizar as funções biológicas dos PAMs na tentativa de reduzir a toxicidade contra as células hospedeiras, mantendo a atividade, aumentando, assim a sua seletividade. Ademais, o design racional de PAMs também tem sido empregado com a finalidade de reduzir os custos de produção, já que existe a possibilidade de gerar estruturas primárias mais curtas, sem comprometimento das suas atividades biológicas (FJELL et al., 2011). Outra estratégia utilizada é o uso de baixas concentrações de PAMs, já que possuem comprovadamente efetividade em baixas concentrações e alta toxicidade em elevadas concentrações (BANDEIRA LIMA et al., 2018).

Pensando nisso, a partir da M-PONTX-Dq3a, dois outros peptídeos foram sintetizados, a M-PONTX-Dq3a [1-15] e M-PONTX-Dq3a [3-15], com a presença de resíduos de arginina nas suas posições 1 e 3, respectivamente. Dentre esses dois peptídeos, M-PONTX-Dq3a [1-15] foi o que apresentou melhor efeito tripanocida (SILVA, 2021). Por fim, ainda na tentativa de melhorar a seletividade da M-PONTX-Dq3a [1-15], diversos análogos foram produzidos baseados nessa Dntx.

2.9 Justificativa

A DC é uma das principais doenças negligenciadas do mundo (OMS, 2018; DNDi, 2021). Considerada uma doença incapacitante, provoca impactos consideráveis nos setores econômicos, políticos e de saúde na sociedade. Os custos para a manutenção da saúde de pessoas infectadas a nível global chegam a 7 bilhões de dólares por ano (SANTOS, 2020).

Apesar disso, o BZN ainda continua sendo o único tratamento aprovado para DC, apresentando eficácia de 80% na DCA e 20% na DCC, em cepas que não apresentam resistência ao BZN. Sua baixa efetividade na DCC somado aos vários efeitos adversos que o paciente apresenta ao longo do tratamento, faz com que haja urgência na pesquisa de novas terapêuticas mais adequadas para a DC (RODRIGUES et al., 2014; CHATELAIN, 2017; MONTEIRO, 2022).

Os PAMs, devido as suas várias atividades comprovadas, tem se tornado um bom alvo para a pesquisa de novas terapêuticas. Pela técnica de design racional, os PAMs podem ser modificados estruturalmente para melhoria da sua atividade e produção de novos peptídeos (LIMA, 2018).

Descrito por CHATELAIN (2017), as Dntx – PAMs do veneno total da *D. quadriceps* – possuem diversas atividades farmacológicas, sendo a atividade antichagásica a de principal interesse para esse estudo. Dentre as Dntx, se destacou a M-PONTX-Dq3a, com alto IS. A partir dela foi sintetizada a M-PONTX-Dq3a [1-15], com bom IS, menor toxicidade e menores custos (MONTEIRO, 2022). Dessa forma, foi pensado na melhoria da atividade desse peptídeo e desenvolvido diversos análogos, sendo um deles a [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15].

Diante disso, são necessários estudos para avaliação da atividade biológica do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] contra as formas de sobrevivência do *T. cruzi*, comparando sua eficácia com o peptídeo de origem e o fármaco de referência, BZN.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito tripanocida do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] da Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15] e sua ação sobre a enzima GAPDH (TcGAPDH) de *T. cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito tripanocida do peptídeo análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*;
- Realizar estudos de docking molecular para avaliar as interações do peptídeo análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a enzima TcGAPDH;
- Verificar as possíveis interações e o efeito do peptídeo análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a enzima TcGAPDH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias em estudo

O processo de desenho e síntese dos peptídeos utilizados no presente trabalho foi realizado em colaboração com a Universidade Federal do ABC Paulista (UFABC), no Laboratório coordenado pelo Prof. Vani Xavier de Oliveira Junior.

No presente trabalho, foi testado o análogo da dinoponeratoxinas [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15], com substituição do resíduo inicial da posição quatro por arginina (Tabela 1). O peptídeo foi desenhado por meio de estratégias de design racional com o auxílio dos softwares “Peptide property calculator” (<http://www.pepcalc.com>) e “Heliquest” (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (GAUTIER et al. 2008), sendo então sintetizada em fase sólida. Em seguida, os peptídeos foram sintetizados em fase sólida.

Para a realização dos experimentos, as soluções de trabalho da Dntx [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] foram preparadas nas concentrações de interesse (50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,5 e 0,7 µM) diluídas em PBS estéril.

Como controle positivo, foi utilizado o BZN. A solução estoque foi preparada a 0,2 M e diluída em DMSO e as soluções de trabalho utilizadas foram preparadas nas concentrações necessárias para atingir as concentrações de interesse (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 e 15,6 µM), diluídas em PBS estéril.

Tabela 1 – Dinoponeratoxinas e suas sequências primárias de aminoácidos.

Dntx	Estrutura
M-PONTX-Dq3a	FWGTLAKWALKAIPAAMGMKQNK
M-PONTX-Dq3a [1-15]	FWGTLAKWALKAIPA
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15]	FWGRLAKWALKAIPA

Fonte: elaborado pela autora.

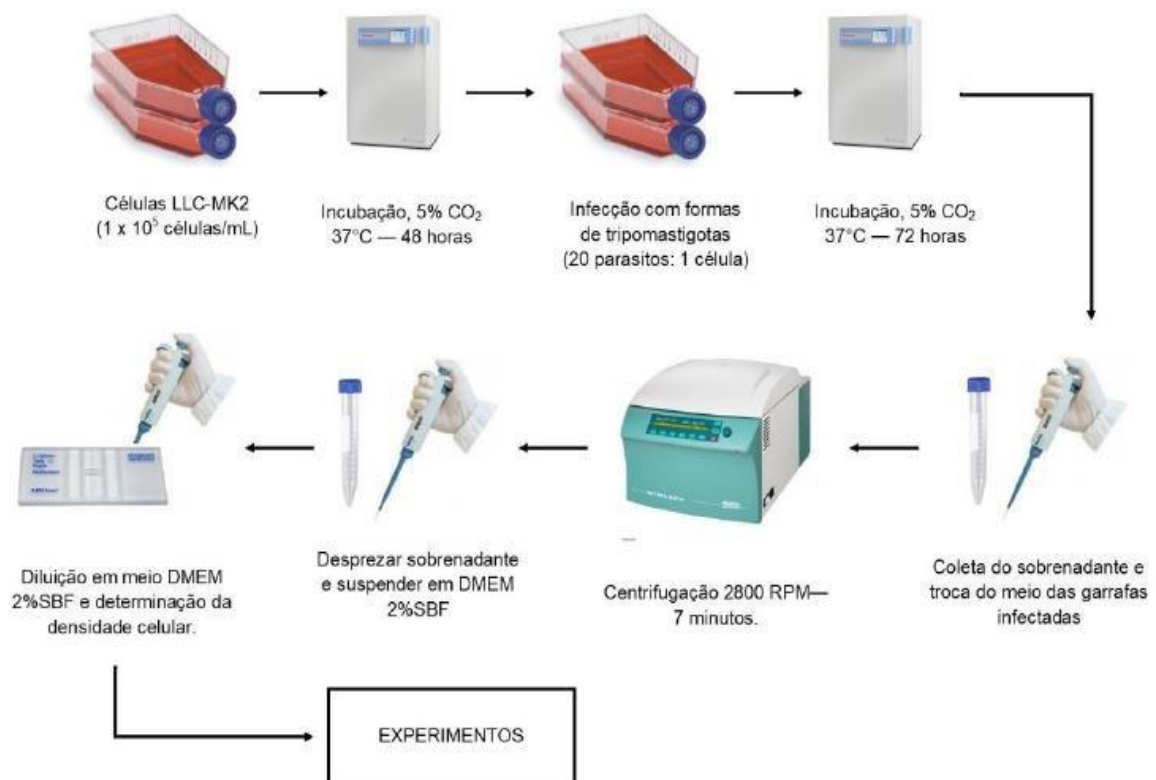
4.2 Cultivo celular de células hospedeiras

As células LLC-MK2, linhagem originada de células epiteliais dos túbulos renais de macaco (*Macaca mulatta*), foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), sendo utilizadas como células hospedeiras para infecção por *T. cruzi*. Para seu cultivo, foi utilizado o meio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e solução de antibióticos a 1% (penicilina – 200 UI.mL⁻¹ e estreptomicina – 130 mg.mL⁻¹). Foram utilizadas garrafas estéreis para o cultivo, mantidas em estufa de CO₂, a 37°C e 5% de CO₂.

4.3 Avaliação do efeito tripanocida do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir da infecção realizada em células hospedeiras LLC-MK2, na concentração de 1×10^5 células/mL de meio DMEM suplementado com 2% de SBF e antibióticos e infectadas com 2×10^6 parasitos/ml, sendo mantidas em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C (figura 7), conforme descrito por LIMA e colaboradores (2016).

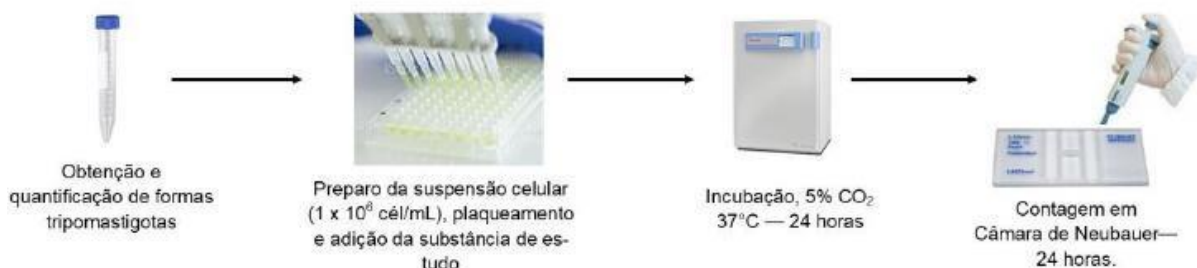
Figura 7: Esquema experimental do cultivo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: MAGALHÃES, 2022.

Para o ensaio de atividade tripanocida, as formas tripomastigotas obtidas foram transferidas para uma placa de 96 poços, na concentração de 2×10^6 de parasitos/ml em meio DMEM com 10% de SBF, tratados com as concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M. Após o tempo de 24 horas de tratamento, foi realizada a contagem do número de parasitos em Câmara de Neubauer. Assim, foi possível estimar a concentração capaz de matar 50% das formas tripomastigotas (LC₅₀) (figura 8) (MAGALHÃES, 2022).

Figura 8: Esquema experimental da avaliação da viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



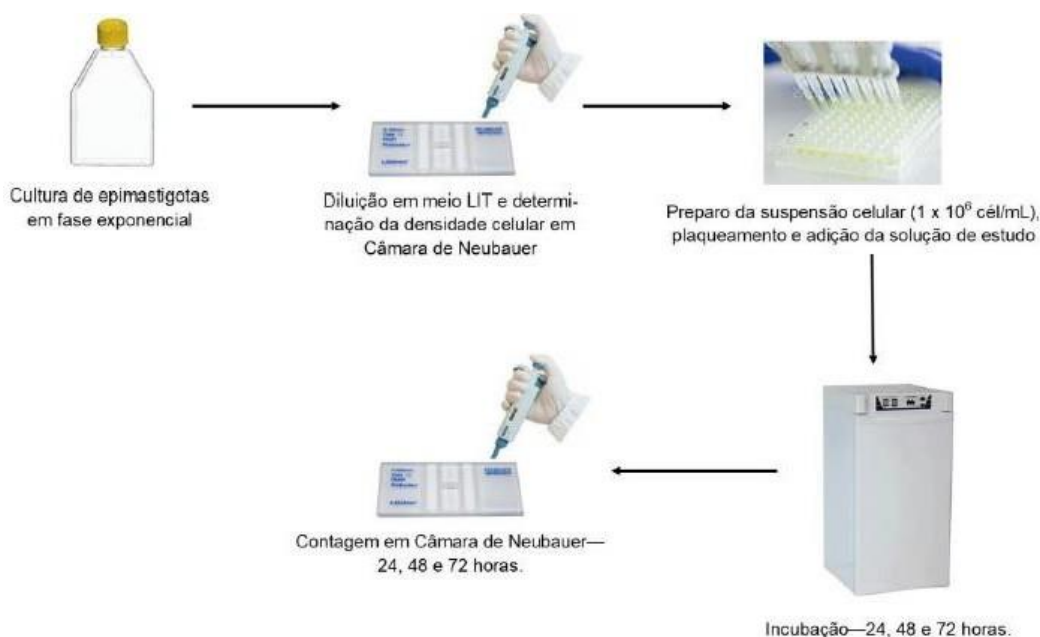
Fonte: MAGALHÃES, 2022.

4.4 Avaliação do efeito do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*

As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementados com 10% SBF e antibióticos, em garrafas de cultivo celular, na concentração de 1×10^6 parasitos/ml, sendo mantidos em uma estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand), a 28°C (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

Para o ensaio, as formas epimastigotas foram transferidas para placas de 96 poços, na concentração de 1×10^6 parasitos/mL de meio LIT suplementado com 10% SBF, sendo tratadas com as concentrações de 19,2; 9,6; 4,8; 2,4; 1,2; 0,6 e 0,3 μ M. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, foi feita a contagem do número de parasitos viáveis, por câmara de Neubauer. Com a determinação do percentual de parasitos viáveis, foi possível estimar a concentração capaz de inibir em 50% a proliferação das formas epimastigotas (IC₅₀) (figura 9).

Figura 9: Esquema experimental da avaliação da viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: MAGALHÃES, 2022.

4.5 Estudos de docking molecular

Para avaliar a possibilidade de interação entre o análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] e a enzima TcGAPDH, foram realizadas as simulações de docking molecular pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GTQE), da Universidade Estadual do Ceará (UECE), coordenado pelo Prof. Dr. Emanuel Marinho.

Para realização da análise, a estrutura tridimensional da TcGAPDH foi obtida 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).

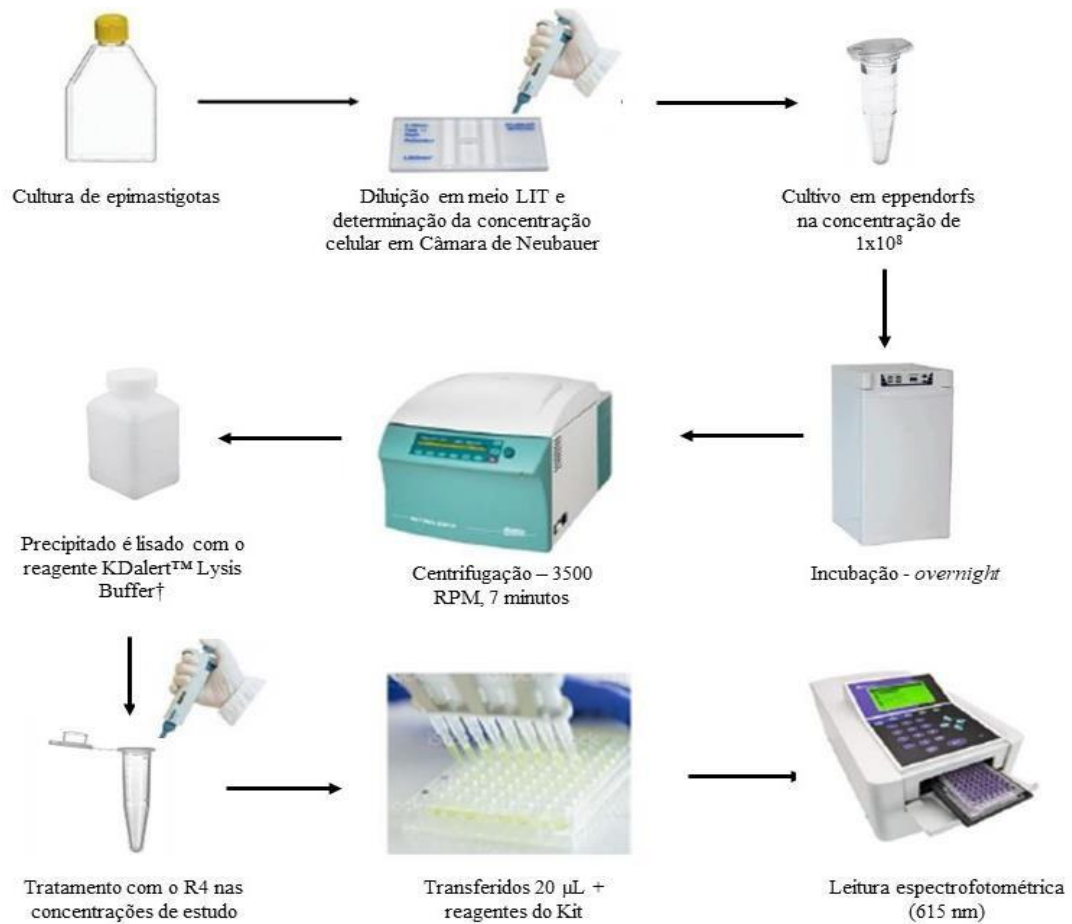
As estruturas tridimensionais (3D) do peptídeo foram obtidas no servidor online I-TASSER (ZHANG, 2009), baseada nas sequências primárias dos peptídeos. As simulações de docking molecular foram realizadas utilizando o servidor ClusPro 2.0 (KOZAKOV *et al.*, 2013).

4.6 Efeito do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a atividade enzimática de TcGAPDH

Para avaliar o efeito do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] na atividade da enzima TcGADPH, foi conduzido o ensaio de atividade enzimática utilizando o kit enzimático “KDAlert™ GAPDH Assay Kit”, que é baseado em fluorescência, mas pode ser adaptado para leitura por espectrofotometria, para medir a atividade enzimática da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH) em células de cultivo variáveis.

Para isso, as formas epimastigotas foram cultivadas na concentração de 1×10^8 de parasito/ml de meio LIT com 10% SBF durante 24 horas em estufa BOD a 28°C. Para extração da enzima, as amostras foram centrifugadas e submetidas ao processo de lise, conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, a fração enzimática foi tratada com a [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] (19,2; 9,6 e 4,8 μM) durante 2 horas, 1 hora, 30 minutos e 15 minutos. Após o tempo de tratamento, foi realizado o plaqueamento das amostras com os reagentes, sendo a leitura da absorbância obtida em leitor de microplacas, com o comprimento de 615 nm. Para obtenção dos valores de atividade enzimática, os valores foram plotados em uma curva padrão, construída nas mesmas condições das amostras, conforme as recomendações do fabricante (figura 10).

Figura 10: Esquema experimental do ensaio enzimático da TcGAPDH.



Fonte: adaptado de MAGALHÃES, 2022.

4.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicada de três experimentos independentes ($n = 3$) e os resultados obtidos expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os valores de LC_{50} e IC_{50} foram determinados por regressão não-linear. A análise entre os grupos foi feita utilizando one-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet, sendo considerado $p < 0,05$ como critério de significância. Todos os testes foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito tripanocida do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*

O efeito tripanocida nas formas tripomastigotas foi avaliada após 24 horas nas concentrações de 50 a 0,78 μM (50; 25; 12; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 μM). Para realização do cálculo de viabilidade celular, foi considerado o controle como 100% e foi possível calcular a LC_{50} do peptídeo (tabela 2). O BZN foi utilizado como controle positivo para fins comparativos.

[Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou LC_{50} de 1,09 μM , mostrando ser cento e quarenta e oito vezes superior ao medicamento padrão (BZN). Em comparação com o peptídeo de origem, apresentou leve aumento de 0,59 a 1,09 μM .

Tabela 2 – Efeito tripanocida da Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15] e o análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] em formas tripomastigotas.

Dntx	LC_{50} (μM)
M-PONTX-Dq3a [1-15] (MONTEIRO, 2022)	0,59 \pm 0,05
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15]	1,09 \pm 0,05
BZN	161,4 \pm 31,8

Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT).

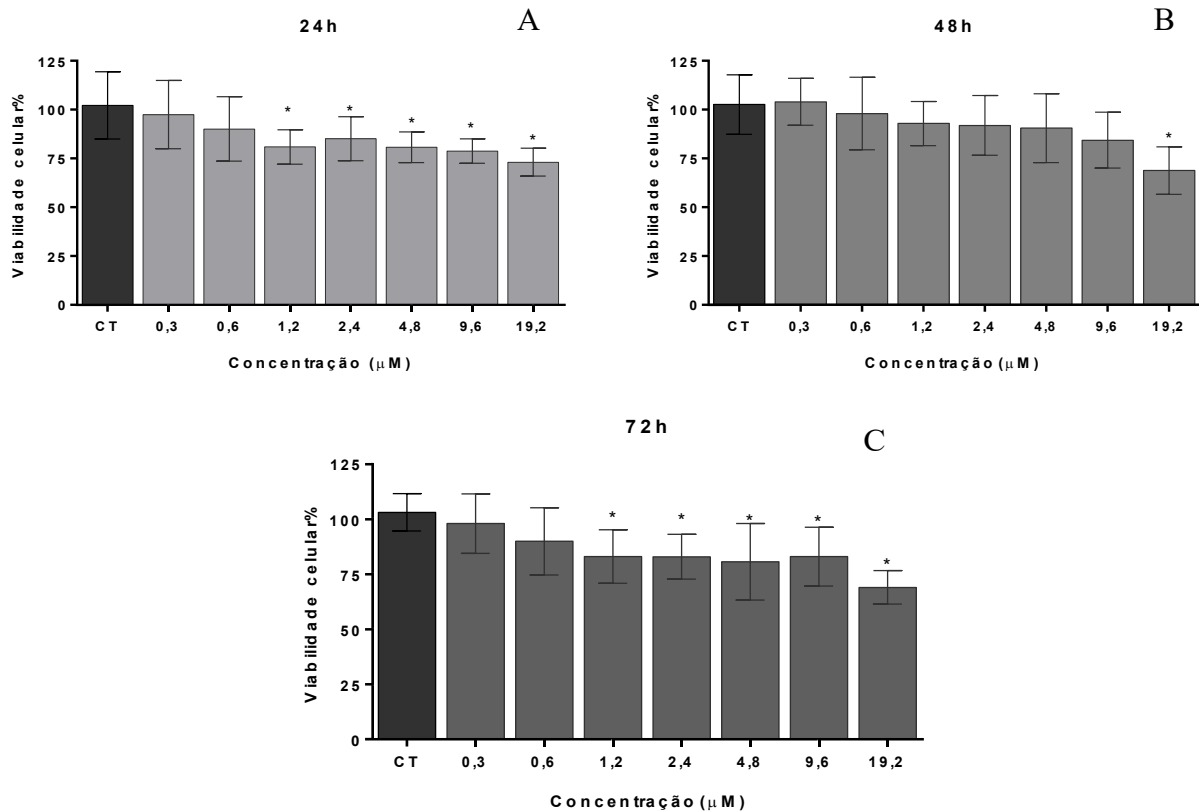
Fonte: elaborado pela autora.

5.2 Avaliação do efeito tripanocida do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

O efeito tripanocida do peptídeo análogo nas formas epimastigotas foi avaliado nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nas concentrações de 19,2; 9,6 e 4,8 μM . Para realização do cálculo de viabilidade celular, foi considerado o controle como 100% e com esses valores foi possível calcular a IC_{50} da [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] em epimastigotas (tabela 4), podendo ser vistos na figura 15.

A [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] causou diminuição da viabilidade celular das formas epimastigotas – quando comparadas ao controle – a partir da concentração de 1,2 μM , com o valor de $\text{IC}_{50} > 19,2$ em todos os tempos avaliados, com melhor atividade no tempo de 24 horas.

Figura 11 - Efeito tripanocida da [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15] em epimastigotas de *T. cruzi*.



Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. *p<0,05 vs. grupo controle (CT).

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 3 – Efeito da Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15] e do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] em formas epimastigotas.

	M-PONTX-Dq3a [1-15] (μM) (MONTEIRO, 2022)	[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] (μM)	BZN (μM)
IC₅₀/24h	7,2 ± 1,4	> 19,2	115,1 ± 16,3
IC₅₀/48h	9,7 ± 0,9	> 19,2	37,4 ± 5,6
IC₅₀/72h	8,7 ± 0,6	> 19,2	22,1 ± 2,9

Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett *p<0,05 vs. grupo controle (CT).

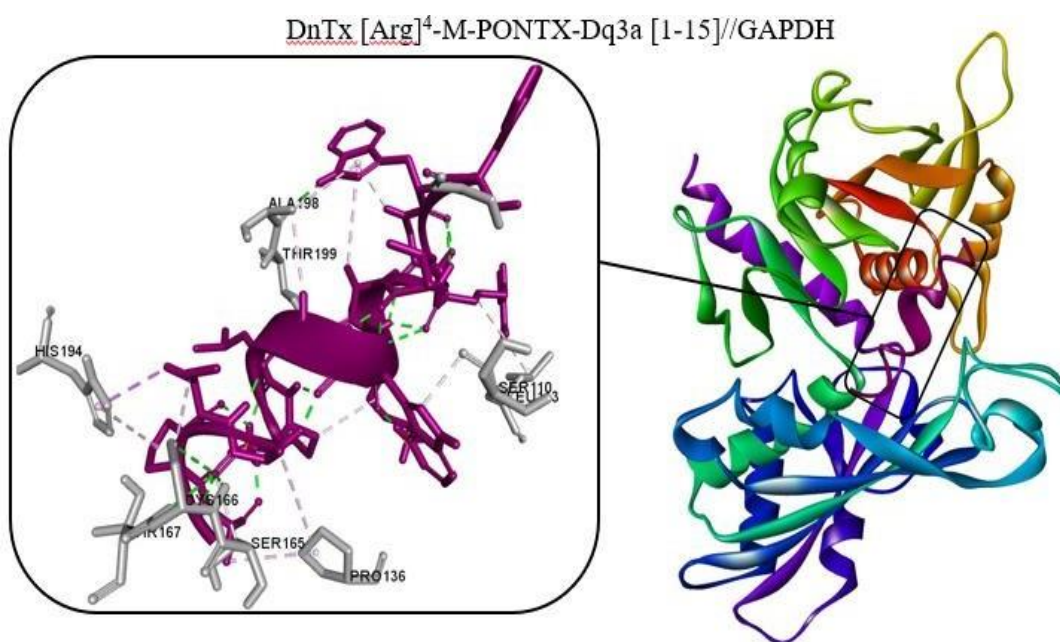
Fonte: elaborado pela autora.

5.3 Docking Molecular

As simulações de interações foram realizadas a partir dos peptídeos com a enzima TcGAPDH e seu já estabelecido inibidor, a chalepina (PETTERSEN et al., 2004). Por meio do ensaio de simulação, foi possível estabelecer a interação entre o análogo $[\text{Arg}]^4\text{-M-PONTX-Dq3a [1-15]}$ e a chalepina, se acoplando em sua cadeia C.

Na tabela 5 pode-se visualizar os sítios que ocorreram as interações entre o peptídeo análogo e a enzima TcGAPDH, comparando com inibidor chalepina. Os resíduos que ocorreram melhores interações com o peptídeo $[\text{Arg}]^4\text{ M-PONTX-Dq3a [1-15]}$ foram Thr167 (3,04), Cys166 (3,22) e Ile13 (1,33).

Figura 12 – Complexo $[\text{Arg}]^4\text{-M-PONTX-Dq3a [1-15]}$ /TcGAPDH.



Fonte: adaptado de MONTEIRO, 2022.

Tabela 4 - Distâncias (Å) de interações entre o peptídeo $[\text{Arg}]^4\text{ M-PONTX-Dq3a [1-15]}$ e resíduos do sítio catalítico da TcGAPDH.

TcGAPDH	$[\text{Arg}]^4\text{ M-PONTX-Dq3a [1-15]}$	Chalepina
Cys166	3,22	1,2
Thr167	3,04	3,7
Arg249	17,73	3,2
Asp210	5,49	3,6

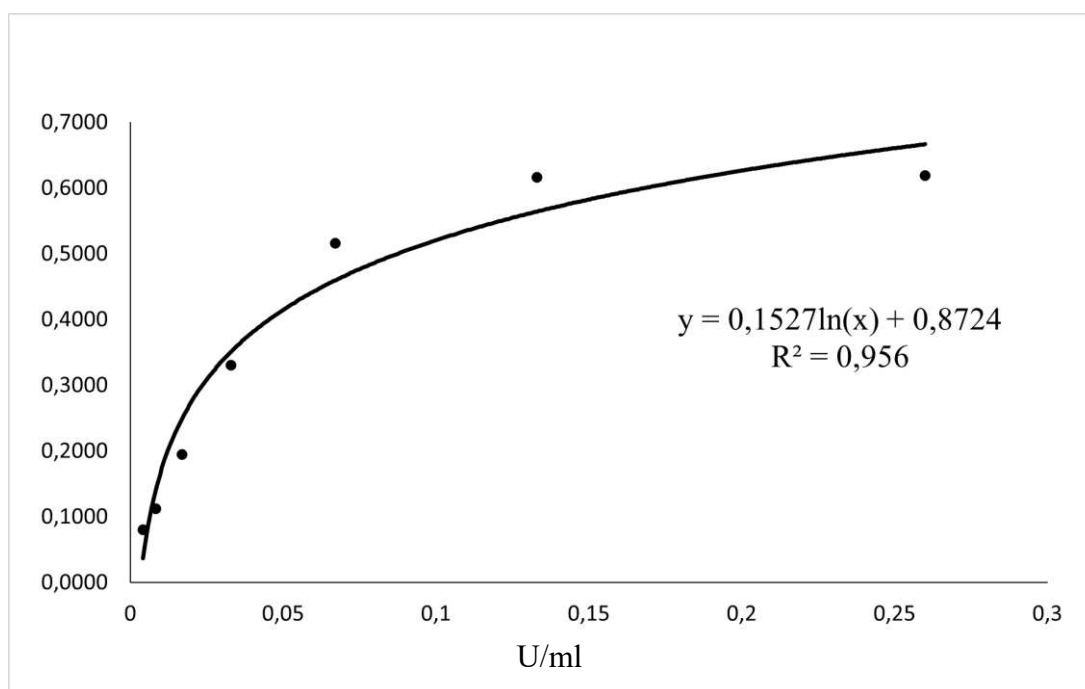
Pro136	4,49	6,2
Ile13	1,33	5,3
His194	3,77	3,1

Fonte: elaborado pela autora.

5.4 Avaliação do efeito do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a atividade enzimática de TcGAPDH

Para avaliação dos dados obtidos no ensaio enzimático, foi construída uma curva de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Kit enzimático (figura 15).

Figura 13 – Curva enzimática da TcGAPDH.



Fonte: elaborado pela autora.

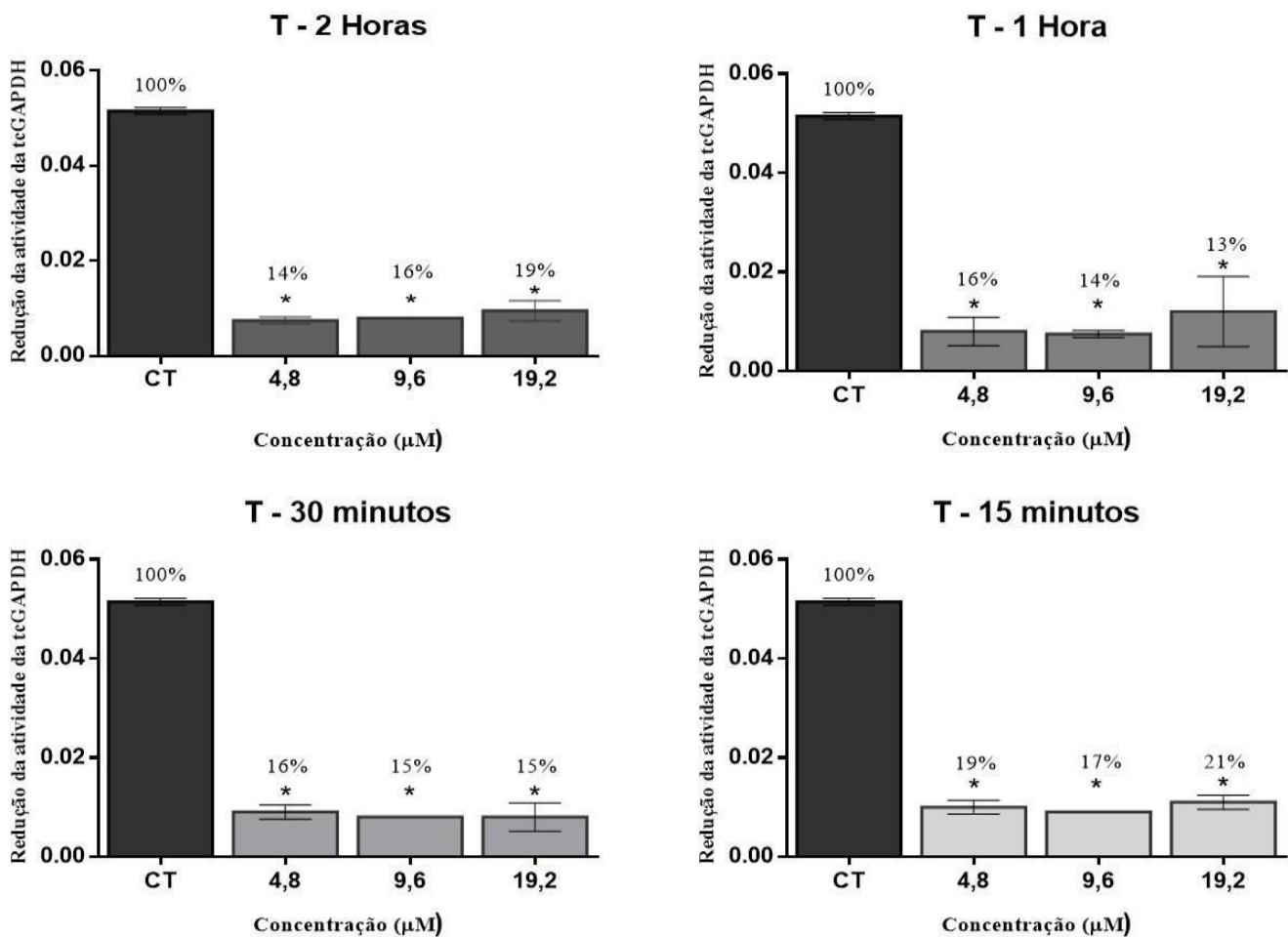
Nas concentrações testadas do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] (19,2; 9,4 e 4,8 μ M), todas apresentaram redução da atividade enzimática TcGAPDH em relação ao controle. Entretanto, não apresentaram diferença significativa entre as concentrações e os tempos avaliados. Na tabela 6, é demonstrado a média dos valores em U/ml e em porcentagem. Todas as concentrações reduziram a atividade da enzima em aproximadamente em 16%, como pode ser visto na figura 16.

Tabela 5 – Atividade enzimática em *T. cruzi* após tratamento com [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15].

Tempo	Concentrações					
	19,2 μ M		9,6 μ M		4,8 μ M	
	U/ml	%	U/ml	%	U/ml	%
2h	0,010	19,006	0,008	16,143	0,007	14,635
1h	0,007	13,135	0,007	14,125	0,008	16,155
30 min	0,008	15,573	0,008	15,744	0,009	16,979
15 min	0,011	21,567	0,009	17,461	0,010	19,458

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 14 – Redução da atividade da enzima TcGAPDH.



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett *p<0,05 vs. grupo controle (CT).

Fonte: elaborado pela autora.

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas (DC) ainda é uma doença que acomete milhares de pessoas e é considerado um problema de saúde pública no Brasil (DNDi, 2021). O Benznidazol (BZN) é a única forma de tratamento disponibilizada atualmente, entretanto mostra ser ineficaz em combater a forma crônica da doença - ocorrendo só em 20% dos casos -, é de difícil adesão devido ao grande número de reações adversas durante seu uso (perda de peso, distúrbios intestinais, leucopenias e outros), além de não poder ser utilizado por pessoas grávidas, insuficientes renais e hepáticos (LOSADA, 2021). Por essas e outras razões, a busca de substâncias tripanocidas veem sendo muito estudadas pelo nosso grupo de pesquisa.

No trabalho em questão, foi estudada a atividade biológica do peptídeo Dntx [Arg]⁴-M-PONTX-Dq3a [1-15], análogo sintético desenvolvido a partir da M-PONTX-Dq3a [1-15], cujo efeito foi descrito previamente por LIMA (2018), diferenciando-se de seu peptídeo de origem devido a substituição do aminoácido Treonina (T) - resíduo menos volumoso, com uma hidroxila - (M-PONTX-Dq3a [1-15]) pelo aminoácido Arginina (R) - resíduo mais volumoso, rico em átomos de nitrogênio, com característica alcalina e carga positiva – na quarta posição.

O análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] surgiu a partir de diversos estudos que avaliaram as propriedades antimicrobianas (LIMA et al., 2014), antifúngicas (DODOU, 2020), anticonvulsivantes, (LOPES et al., 2013) e tripanocidas (LIMA et al., 2016, 2017; SILVA et al., 2021) do veneno total das dinoponeratoxinas de *D. quadriceps* e seus fragmentos.

Como estudo inicial, o análogo apresentou efeito tripanocida nas formas tripomastigotas, o qual foi muito superior ao do fármaco de referência. Ademais, o peptídeo também foi capaz de inibir a proliferação das formas epimastigotas em baixas concentrações. Por fim, através de estudos *in silico* e *in vitro* com a enzima TcGAPDH, constatou-se que o análogo do presente trabalho foi capaz de inibir a atividade dessa enzima.

Estudos anteriores afirmam que substituições com arginina aumentaram a seletividade para as formas parasitárias de *T. cruzi* (PEDRON, 2020). Ademais, a presença de arginina em alguns peptídeos aumenta a sua permeação além das barreiras e membranas celulares (TORRES, 2013).

Parâmetros como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico são características que influenciam bastante na eficácia da ação do PAM, por isso são bastante analisadas no momento da construção/modificação de PAMs por design racional (GUIMARÃES, 2015). No caso deste estudo, a principal característica alterada do peptídeo M-PONTX-Dq3a [1-15] para a [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] foi sua carga, passando ser mais carregado positivamente pela presença do aminoácido arginina. De acordo com a literatura, essa alteração que promove o aumento da

polaridade na estrutura do PAM, torna-o mais seletivo para membranas de superfície negativa, como os fosfolípidios carregados negativamente na membrana do *T. cruzi*, membranas bacterianas, entre outras (GUIMARÃES, 2015; MONTEIRO, 2022). Entretanto, essa alteração de carga tem um limite para cada peptídeo, podendo se tornar um fator que corrobore para a instabilidade do PAM, comprometendo sua atividade biológica (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

Quando comparados os ensaios de atividade tripanocida com as formas tripomastigotas, obtidas a partir da infecção de células LLC-MK2, [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou LC₅₀ superior ao do peptídeo original. Entretanto, ainda se encontra nos limites recomendados pela OMS, se caracterizando como uma molécula promissora para demais estudos. Também é preciso considerar o desenvolvimento racional que cerca a produção do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15], um peptídeo menor, com maiores chances de ser produzido a menores custos, além de seu efeito cento e quarenta e oito vezes maior que o fármaco de escolha para a DC.

O R8b, análogo do PAM Cupienina 1a – isolado da peçonha da aranha *Cupiennius salei* – foi promissor em diversas aplicações, como: antimicrobiana e antifúngica. Entretanto, ainda apresentava citotoxicidade importante. Por isso foi escolhida para ser modificada racionalmente, sendo uma dessas alterações a troca por aminoácidos carregados positivamente, como a lisina e arginina. Essas alterações originaram 6 peptídeos, sendo quatro deles o R8b1, R8b3, R8b5 e R8b6, que apresentaram aumento na sua efetividade contra bactérias gram positivas e negativas, além do aumento da atividade fungicida, mostrando que adição de aminoácidos com maior carga pode trazer grandes benefícios para a ação do peptídeo (DORIA, 2021).

Em outro estudo, de MONTEIRO e colaboradores (2022), mostrou que a substituição do resíduo da posição três por lisina na Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15] foi capaz de elevar a seletividade em relação ao peptídeo original. Dessa forma, podemos inferir que o aumento da ação tripanocida pode estar relacionada ao aumento da carga e da posição do aminoácido na M-PONTX-Dq3a [1-15].

Estudos como a adição de mais aminoácidos com carga positiva a estrutura do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] pode ser pensado, com o fim de atestar o quão benéfico é o aumento da polaridade deste peptídeo para sua atividade frente as formas de sobrevivência do *T. cruzi*, além de avaliar qual seria seu ponto de limite de adições de cargas para não levar a perda de atividade.

Assim, é possível identificar que a modificação de um PAM requer uma análise profunda e estudo prévio, para que no fim haja melhorias na sua atividade. Modificações como

as citadas acima ajudam a entender de melhor maneira o peptídeo em estudo e fornece uma direção a ser seguida para alcançar a máxima efetividade do PAM por meio de seu design racional.

Apesar do mecanismo de ação predominante da maioria dos PAMs ser conhecido por sua interação e provocar disfunção da membrana celular, é de suma relevância buscar outros mecanismos que possam reforçar o efeito tripanocida de peptídeos antimicrobianos (MONTEIRO et al., 2022). Nesse sentido, dentre os muitos alvos que veem sendo estudados nas pesquisas de atividade tripanocida, como a via glicolítica de *T. cruzi*, destacando-se a enzima TcGAPDH (PROKOPCZYK, 2012).

Para avaliação da interação do peptídeo substituído com a enzima TcGAPDH, foram conduzidos, inicialmente, estudos de docking molecular que apresentaram resultados favoráveis à interação entre as duas proteínas, já que as possíveis interações ocorreram na mesma região do inibidor co-cristalizado, a chalepina.

Quando analisados os resíduos da TcGAPDH que interagiram com o peptídeo, destacam-se os resíduos de Thr167, Cys166 e Ile13, sendo esses dois primeiros presentes na região do sítio catalítico da enzima, onde ocorre a interação com o NADH, e sua conversão em NAD⁺, tanto em *T. cruzi*, quanto em *Leishmania mexicana* (ALVES et al., 2020; PAVÃO et al., 2002; REIS et al., 2013), possivelmente levando ao processo de oxirredução da TcGAPDH e diminuição da sua atividade (VINHOTE, 2015). É importante ressaltar que a inibição da atividade da TcGAPDH impede que a enzima G3P seja convertida em 1,3-BPG, impedindo a cascata de reações para a formação de ATP, prejudicando a sobrevivência do parasito (PROKOPCZYK, 2012).

Diferentemente do apresentado aqui, simulações realizadas com M-PONTX-Dq3a [1-15] e TcGAPDH não foram favoráveis à interação, levando a supor que a substituição na posição quatro do peptídeo pode afetar a interação com outros alvos do parasito (MONTEIRO et al., 2022). Ademais, outro estudo demonstrou que a inserção de resíduos de arginina em outras posições (3, 7, 10 e 11) não foram favoráveis à interação com a TcGAPDH, mas foram favoráveis a interações com outros alvos, como cruzaína e tripanotiona redutase, o que reforça a importância da posição quatro para o provável efeito biológico dessa classe de peptídeos (MONTEIRO et al., 2022).

Por fim, para comprovar se a interação observada no estudo *in silico* seria capaz de ativar ou inibir a TcGAPDH, foram conduzidos estudos de atividade enzimática em formas epimastigotas previamente tratadas com [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15]. As formas

epimastigotas foram escolhidas por serem de fácil cultivo e por já terem sido utilizadas em estudos prévios de atividade enzimática (MENEZES, 2017).

No teste enzimático ficou evidenciado a inibição da atividade da enzima TcGAPDH, a qual não se demonstrou de forma dependente de tempo e concentração. Entretanto, reduziu significativamente a função da enzima alvo em baixas concentrações. Isso reforça que o estudo *in silico* demonstrou resultados expressivos. Esse grande efeito inibitório do referido análogo nas concentrações talvez possa ser mantido em concentrações ainda menores, que não apresentaram efeito tripanocida, podendo esse efeito em TcGAPDH provocar a morte dos parasitos em um tempo maior de tratamento, necessário para o colapso das cascatas de produção energética (PROKOPCZYK, 2012). Contudo, estudos mais aprofundados necessitam ser realizados.

Em suma, foi identificada a ação inibitória do peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] sobre a enzima TcGAPDH, abrindo perspectivas para novos modos de ação de peptídeos antimicrobianos que vão além daqueles estritos à membrana celular, o que pode influenciar em seu modo de ação.

Por isso se faz necessária a adição de estudos complementares que visem uma possível modificação do análogo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15] com o fim de manter sua ação sobre a TcGAPDH, com o propósito de melhorar sua atividade tripanocida e possivelmente ser alvo de estudos *in vivo*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A substituição por arginina na posição quatro da Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15], gerando o peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15], causou a morte em baixas concentrações nas formas tripomastigotas (formas infectantes) e epimastigotas, provocando a diminuição de parasitos viáveis, principalmente no tempo de 24 horas, podendo estar associada a inibição da atividade de enzima TcGAPDH, provavelmente por meio da interação desta com os resíduos de importância no sítio catalítico. Dessa forma, este trabalho abre perspectivas de estudos complementares que visem novas modificações na Dntx M-PONTX-Dq3a [1-15] e seus análogos, como a [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15], a fim de prover melhorias na atividade do peptídeo, possibilitando estudos *in vivo* de atividade antichagásica, bem como manter sua atividade sobre a TcGAPDH, alvo de suma importância para a sobrevivência e homeostasia do parasito.

REFERÊNCIAS

- ADADE, Camila Marques; PADRÓN, Thaïs Souto. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, [s. l.], v. 4, p. 178-187, 2010. Disponível em: <https://openparasitologyjournal.com/contents/volumes/V4/TOPARAJ-4-178/TOPARAJ-4-178.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2022.
- ALEXANDRE, J.P; A.P; JÚNIOR, G. Tratamento da doença de Chagas:um antigo problema etiológico da doença-vol 20, nº2, PP 91-96-Out/dezembro 2014-**Revista UNINGÁ**.
- ALVES, K. M. A. et al. Design of Inhibitors for Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Enzyme of *Leishmania mexicana*. **Medicinal chemistry** (Shariqah (United Arab Emirates)), v. 16, n. 6, p. 784–795, 2020.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos: hospedeiro e parasita. **Doença de chagas: manual para experimentação animal** [online], p. 175–196, 2000.
- BATISTA, V. S.; FARIAS, R. L.; SIMÕES, L. P. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. CONSTRUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E ANCORAGEM MOLECULAR DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM BIOMACROMOLÉCULAS: UM TUTORIAL PRÁTICO. **Química Nova**, vol. 45, n. 2, p. 223–234, 2022.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruz* n. gen, n. ap, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1–170, 1909.
- CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2017.
- COLOGNA, C. T.; CARDOSO, J. D. O. S. S.; JOURDAN, E.; DEGUELDRE, M.; UPERT, G.; GILLES, N.; UETANABARO, A. P.; COSTA NETO, E. M.; THONART, P.; DE PAUW, E.; QUINTON, L. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the Giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. **J Proteomics.**, v94, p413-22, 2013.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.28, n.2, p.83-84. 2006
- DODOU LIMA, H. V.; CAVALCANTE, C. S. DE P.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Antifungal In Vitro Activity of Pulosulin and Ponericin-like Peptides from the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* and Synergistic Effects with Antimycotic Drugs. **Antibiotics**, 2020.
- DOENÇA DE CHAGAS – PORTAL FIOCRUZ. **FIOCRUZ**, 2020. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 04 de maio. de 2021.

DORIA, JULIANA ARRUDA S. **PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DAS CUIPIENINAS**. 2021. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília - Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia, [S. l.], 2021.

INICIATIVA MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS. DNDi Doença de Chagas. [S. l.], 15 maio 2021. Disponível em: <<https://dndial.org/>>. Acesso em: 14 nov. 2022.

FJELL, C.D., HISS, J.A., HANCOCK, R.E., SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Dec 16;11(1):37-51. doi: 10.1038/nrd3591.

FRANCISCO, A. F. et al. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology*, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, dez. 2017.

Freire KA, Torres MT, Lima DB, Monteiro ML, Bezerra de Menezes RRPP, Martins AMC, Oliveira VX Jr. Wasp venom peptide as a new antichagasic agent. *Toxicon*. 2020 Jul 15;181:71-78. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.04.099. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32360153.

GUIMARÃES, Aline Barbosa. **SÍNTESE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS E ANTIPARASITÁRIAS DE ANÁLOGOS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS**. 2015. Tese (Doutorado - Pós-Graduação em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas, [S. l.], 2015.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. *Toxicon*, v. 92, p. 193–200, 2014.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein and Cell*, v. 1, n. 2, p. 143–152, 2010.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *Journal of Computational Chemistry*. v. 28, n.6, p. 1146-1152, 2007.

Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Vajda S. How good is automated protein docking? *Proteins*. 2013 Dec;81(12):2159-66. doi: 10.1002/prot.24403. Epub 2013 Oct 17. PMID: 23996272; PMCID: PMC3934018.

LEE, G. M. et al. Mapping inhibitor binding modes on an active cysteine protease via nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, v. 51, n. 50, p. 10087–98, 18 dez. 2012.

LEITE, MARIANNY KAROLINI. Perspectivas de novos tratamentos para doença de chagas/Marianny Karolini Leite. Fundação Educacional Vale do São Francisco – FEVASF-MG. Iguatama, 2019. 36f

LIMA, D. B.; TORRES, A. F.; MELLO, C. P.; DE MENEZES, R. R.; SAMPAIO, T. L.; CANUTO, J. A.; DA SILVA, J. J.; FREIRE, V. N.; QUINET, Y. P.; HAVT, A.; LIMA, DÂNIA. VENENO DA FORMIGA *Dinoponera quadriceps* COMO FONTE DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS / Dânia Lima. – 2018. 158 f.: il. color.

LIMA, D. B. et al. Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera:Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 390–6, ago. 2014.

LIMA, D. B. et al. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128–132, 2016.

LIMA, D. B. et al. The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display in vitro antitrypanosomal activity. **Biological Chemistry**, v. 0, n. 0, jan. 2018.

LOPES, K. S. et al. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. *Neurochemistry International*, v. 63, n. 3, p. 141–5, set. 2013.

MAGALHÃES, E. P. Efeito tripanocida de 2-hidroxi-3,4,6- trimetoxifenilchalconas em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 2022. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/66452>. Acesso em: 14/06/2022.

MENEZES, RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE. Efeito tripanocida do (-)-alfa-bisabolol sobre a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* / Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes. - 2017. 138 f. : II. Color.

Menezes RRPPB, Sampaio TL, Lima DB, Sousa PL, de Azevedo IEP, Magalhães EP, Tessarolo LD, Marinho MM, Dos Santos RP, Martins AMC. Antiparasitic effect of (-)- α -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2019 Nov;95(3):114860. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.012. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31353066.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim epidemiológico, abril de 2022. Boletim Epidemiológico - Doença de Chagas, [S. l.], v. 2, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf. Acesso em: 14 nov. 2022. BORGES-PEREIRA, J. et al. Epidemiologia da doença de Chagas em quatro localidades rurais de Jaguaruana, Estado do Ceará. Soroprevalência da infecção, parasitemia e aspectos clínicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 345-351, jul/ago, 2008.

MONTEIRO ML, Lima DB, Freire KA, Nicolaski Pedron C, Magalhães EP, Silva BP, García-Jareño AB, De Oliveira CS, Nunes JVS, Marinho MM, Menezes RRPPB, Orzaéz M, Oliveira Junior VX, Martins AMC. Rational design of a trypanocidal peptide derived from *Dinoponera quadriceps* venom. **Eur J Med Chem**. 2022 Nov 5;241:114624. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114624. Epub 2022 Jul 31. PMID: 35933786.

MORAES-, H.S; SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional. **Rev. História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, v. 44, supl. II, p. 64-67, 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

- PAIVA, R. V. S.; BRANDÃO, C. R. F. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera Roger* (Hymenoptera Formicidae). **Ethology Ecology & Evolution**, v. 7, n. 4, p. 297–312, out. 1995.
- PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.
- PETTERSEN, E. et al. UCSF Chimera -a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- PAVÃO, F. et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS letters**, v. 520, n. 1–3, p. 13–7, 5 jun. 2002.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, n. 18, 2019.
- PROKOPCZYK, Igor Muccilo. Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e avaliação bioquímica por calorimetria de titulação isotérmica. 2012. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012. doi:10.11606/D.75.2012.tde-17042012-170802. Acesso em: 2022-08-21.APA
- REIS, M. et al. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* elucidated via the QM/MM approach. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, v. 15, n. 11, p. 3772–85, 21 mar. 2013.
- REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003540, 13 fev. 2015.
- SANTOS, V. C.; FERREIRA, R. S. Computational approaches towards the discovery and optimisation of cruzain inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 117, 2022.
- SCHMIDTCHEN, A.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 265–274, 2014.
- SILVA, Brenna Pinheiro. Efeito tripanocida de peptídeos derivados das dinoponeratoxinas. Orientador: Alice Maria Costa Martins. 2021. Monografia (Graduação - Farmácia) - Graduação, [S. l.], 2021.
- SILVA, C.M; TAVARES, E.G; KANASHIRO, C.A. Uso de células tronco da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Revista eletrônica*, vol. 2, n. 5, 2011.
- SOUSA, P. L. et al. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 213–6, 31 out. 2012.
- SRIRAMULLU, D. K.; WU, S.; LEE, S.G. Effect of ligand torsion number on the AutoDock mediated prediction of protein-ligand binding affinity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 83, p. 359-365, 2020.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–77, 2012.

TORRENT, M. et al. Ribonucleases as a host-defence family: evidence of evolutionarily conserved antimicrobial activity at the N-terminus. **The Biochemical Journal**, v. 456, n. 1, p. 99–108, 15 nov. 2013.

TORRES, AFC; QUINET, YP; HAVT, A; RÁDIS-BAPTISTA, G; MARTINS, AMC (2013) Molecular pharmacology and toxinology of venom from ants. In: Rádis-Baptista G editor. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: An Integrated view of the molecular recognition and toxinology 2013 From analytical procedures to biomedical applications*. ISBN 978-953-51-1151-1 pp. InTech, DOI: 10.5772/53539. Available: <<http://www.intechopen.com/books/anintegrated-view-of-the-molecularrecognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-tobiomedicalapplications/molecularpharmacology-and-toxinology-of-venom-fromants>>.

TOSO, M. A.; VIAL, U. F.; GALANTI, N. Oral transmission of Chagas' disease. **Revista Medica de Chile**, v. 139, n. 2, p. 258–66, fev. 2011.

VINHOTE, J. F. C. et al. Trypanocidal activity of mastoparan from *Polybia paulista* wasp venom by interaction with TcGAPDH. **Toxicon**, v. 137, p. 168-172, 2017.

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