



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JULIANA FREIRE CHAGAS VINHOTE

Ação tripanocida de um mastoparano de *Polybia paulista* e seu possível mecanismo de ação

FORTALEZA - CE

2015

JULIANA FREIRE CHAGAS VINHOTE

Ação tripanocida de um mastoparano de *Polybia paulista* e seu possível mecanismo de ação

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA - CE

2015

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

V785a Vinhote, Juliana Freire Chagas.
 Ação tripanocida de um mastoparano de *Polybia paulista* e seu possível
 mecanismo de ação / Juliana Freire Chagas Vinhote. – 2015.
 100 f. : il. color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Venenos de Vespas. 2. Antiparasitários. 3. Trypanosoma cruzi. I. Título.

CDD 616.9363

JULIANA FREIRE CHAGAS VINHOTE

Ação tripanocida de um mastoparano de *Polybia paulista* e seu possível mecanismo de ação

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof^a. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof. Dr. Daniel Freire de Sousa
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedicatória

- Aos meus pais, *Luiz e Ester*, pelo apoio, incentivo e amor durante toda a minha vida.
- Ao meu marido, *Ciro Vinhote*, pela força e confiança.
- Ao meu filho João Vitor, que esteve presente nessa etapa final. E ao pequeno Davi que está crescendo e participando desse sonho.
- Aos meus irmãos, *Patrícia, Renata e Luiz* pela amizade e carinho.
- Aos meus avós *Jaime e Alaíde (in memoria)*, *José (in memoria)* e *Lúcia* meus exemplos de vida.
- Ao meu sogro e minha sogra que sempre me incentivaram a vencer e concluir com força e determinação essa etapa.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Quero agradecer primeiramente a Deus, porque sem ele eu não teria forças para continuar esse trabalho. Minhas preces diárias e constantes me ajudaram, e ajudam, a superar minhas fraquezas e continuar cada dia com um novo ânimo. Obrigada por está comigo em todos os momentos.
- ✓ À minha orientadora, Dra. *Alice Maria C. Martins*, pela orientação segura, conhecimentos profundos e a quem sou grata por ensinamentos que levarei por toda a vida.
- ✓ Ao Prof. Dr. Alexandre Havt da Universidade Federal do Ceará - UFC que muito contribuiu para iniciar a caminhada desse trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Mario Sergio Palma da Universidade Estadual Paulista - UNESP, por ter cedido o peptídeo isolado do veneno da vespa *Polybia paulista* e por todas atenção durante as conversas virtual.
- ✓ A Bibiana Souza da Universidade Estadual Paulista – UNESP, por realizar o isolamento do Mastoparano.
- ✓ Ao professor do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ricardo Santos pela contribuição e pela atenção durante as trocas de e-mails sempre com esclarecimentos válidos.
- ✓ A doutoranda Danya Bandeira Lima que esteve ao meu lado durante todos os anos de doutorado e muito me ajudou no Laboratorio de Cultivo Celular – LCC.
- ✓ Ao doutorando Ramon Menezes por sua grande colaboração no Laboratorio de Cultivo Celular – LCC.
- ✓ Aos colegas de pós graduação Clarissa, Jader e Ticiania pelo prestimoso apoio no transcorrer dos experimentos no LCC.
- ✓ Aos colegas do curso de graduação e de pós-graduação do Laboratório de Cultivo Celular (LCC) pela colaboração.

- ✓ A todos os professores de Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que enriqueceram meus conhecimentos durante os anos dedicados ao curso de pós-graduação.
- ✓ À Fundação Cearense de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro durante os primeiros anos realizados do doutorado.
- ✓ Ao professor e amigo *Raimundo Oliveira de Souza*, pela paciência, estímulo e atenção, sempre oferecidos.
- ✓ Aos meus colegas de profissão do curso de Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará pelo apoio e incentivo para realização deste trabalho.
- ✓ A ex-secretária do Programa de Pós-graduação em Farmacologia *Aurea Hanes*, que ainda antes de sua aposentadoria me ajudou em muitos momentos.
- ✓ A atual secretária do Programa de Pós-graduação em Farmacologia *Célia* pelas orientações e informações administrativas do programa.
- ✓ Aos participantes da banca, por aceitarem o convite e pela dedicação à leitura desta tese de doutorado.

Enfim, agradeço a todos os meus familiares e amigos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho!

***“Se fui capaz de ver mais longe,
é porque me apoiei em ombros de
gigantes.”***

Issac Newton

RESUMO

Ação tripanocida de um mastoparano de *Polybia paulista* e seu possível mecanismo de ação

A doença de Chagas, considerada uma doença negligenciada, é uma infecção parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi* e endêmica em diversos países. No Brasil, apenas o Benzonidazol é usado para o tratamento da doença. Nesse contexto, o potencial terapêutico das toxinas vem cada vez mais conquistando espaço e despertando grandes interesses da comunidade científica. Os venenos de invertebrados têm apresentado grande interesse como fonte de substâncias bioativas. Os mastoparanos, a classe mais amplamente descrita de peptídeos isolados a partir da peçonha de vespas, já evidenciaram diferentes atividades biológicas. Assim, os peptídeos isolados têm despertado interesse científico como fonte de modelos moleculares para o possível desenvolvimento de novas terapias farmacológicas. Este estudo investigou o efeito do peptídeo mastoparano (MP) isolado do veneno da vespa *Polybia paulista* sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seu possível mecanismo de ação. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas, tratadas com diferentes concentrações de MP e incubadas durante 24, 48 e 72 horas. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas através de infecção de células LLCMK2 foram subcultivadas, tratadas com diferentes concentrações de MP e incubadas durante 24 horas. Para investigar a participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) no efeito citotóxico do mastoparano sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, placas foram incubadas com a CI_{50} de 24h de MP e a análise da emissão de fluorescência foi realizada em citometria de fluxo após adição de DCF. O efeito de mastoparano sobre o potencial de membrana mitocondrial das formas epimastigotas foi realizado pelo ensaio com rodamina 123. A citotoxicidade foi avaliada sobre células Raw 264.7 e a viabilidade dos macrófagos foi determinada utilizando o ensaio com MTT. No estudo de *Docking* molecular, obteve-se inicialmente a estrutura tridimensional do mastoparano a partir da sequência primária em programa específico. Após análise dos sítios de ligação entre peptídeo e enzima TcGAPDH, a estrutura cristalográfica do complexo TcGAPDH-chalepina foi utilizada para comparação. O mastoparano inibiu o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando uma CI_{50} de 102 $\mu\text{g/mL}$, 53,95 $\mu\text{g/mL}$ e 58,51 $\mu\text{g/mL}$ para 24, 48 e 72 horas de incubação respectivamente. Na análise da produção de espécies reativas houve um aumento significativo na intensidade relativa de fluorescência, quando comparado ao grupo controle. O peptídeo alterou o potencial da membrana mitocondrial do parasita. Para as formas tripomastigotas a CI_{50} foi 8,83 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de incubação. A citotoxicidade do mastoparano avaliada em macrófagos não induziu morte celular significativa nas diferentes concentrações estudadas. No estudo de *docking*, foi evidenciado o acoplamento do mastoparano na TcGAPDH, demonstrando os diferentes sítios de ligação dos resíduos de aminoácidos do centro ativo da enzima e comparando a semelhança na posição ocupada pela molécula chalepina na TcGAPDH. Conclui-se que o mastoparano apresentou atividade tripanocida envolvendo a participação do estresse oxidativo e alteração do potencial de membrana sem apresentar citotóxica em células de macrófagos e parece inibir a TcGAPDH de *T. cruzi*. Portanto, o mastoparano se destaca como importante molécula bioativa contra os parasitas.

Palavras-chave: Venenos de vespas, antiparasitários, *Trypanosoma cruzi*

Abstract

Trypanocidal action: A mastoparan isolated from *Polybia paulista* and its possible mechanism action

Chagas disease, a neglected disease, is a parasitic infection caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and is endemic in several countries. In Brazil, only benznidazole is used for treating the disease. In this context, the therapeutic potential of toxins is increasingly gaining ground and stirring interest in the scientific community. The poisons of invertebrates have become intriguing as a source of bioactive substance. The mastoparan, the most widely described class of peptides isolated from the venom of wasps, already shows different biological activities. Thus, isolated peptides have attracted scientific interest as a source of molecular model for the possible development of new drug therapies. This study investigated the effect of mastoparan peptide (MP) isolated from the venom of a *Polybia paulista* wasp on the Y strain of *T. cruzi* and its possible mechanism of action. Epimastigote forms of *T. cruzi* were grown, treated with various concentrations of MP, and incubated for 24, 48, and 72 hours. Trypomastigote forms of *T. cruzi* obtained by LLCMK2 cells infected were subcultured, treated with various concentrations of MP, and incubated for 24 hours. To investigate the involvement of reactive oxygen species (ROS) in the mastoparan cytotoxic effect on *T. cruzi* epimastigotes, plates were incubated with IC50 of 24 MP; an analysis of fluorescence emission was performed via flow cytometry after adding dichlorofluorescein (DCF). The mastoparan effect on the mitochondrial membrane potential of epimastigotes was tested with rhodamine 123. Cytotoxicity was assessed on RAW 264.7 cells, and the viability of macrophages was determined using the microculture tetrazolium (MTT) assay. In the study of molecular docking, the three dimensional structure of the mastoparan was originally obtained from the primary sequence specific program. After analyzing the binding sites of the peptide and *T. cruzi* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH) enzyme, the crystal structure of the TcGAPDH-chalepina complex was used for comparison. The mastoparan inhibited the growth of *T. cruzi* epimastigotes, with an IC50 of 102 µg/ml, 53.95 µg/ml, and 58.51 µg/ml for 24, 48, and 72 hours of incubation, respectively. In the analysis of the ROS generation, there was a significant increase in the relative fluorescence intensity compared to the control group. The peptide change had the potential of mitochondrial membrane of the parasite. For trypomastigotes, the IC50 was 8.83 µg/ml after 24 hours of incubation. The cytotoxicity of mastoparan evaluated in macrophages did not induce significant cell death in the different concentrations studied. In the docking study, coupling mastoparan was evidenced in TcGAPDH, showing different binding sites residue of the enzyme's active center amino acids and comparing the similar position occupied by the molecule in TcGAPDH- chalepina. It follows that the mastoparan showed trypanocidal activity involving the involvement of oxidative stress and changes in membrane potential without displaying cytotoxic cells; the macrophages seem to inhibit TcGAPDH *T. cruzi*. Therefore, the mastoparan stands out as an important bioactive molecule against parasites.

Keywords: Poison wasps, antiparasitic, *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.....	21
Figura 2. Estrutura Química do Benzonidazol	24
Figura 3. Desenho esquemático dos ensaios de citotoxicidade em formas epimastigotas de cepa Y <i>T. cruzi</i>	43
Figura 4. Desenho esquemático da análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio	44
Figura 5. Desenho esquemático do protocolo experimental do potencial transmembrânico mitocondrial	46
Figura 06. Desenho esquemático dos ensaios de citotoxicidade em formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
Figura 07. Desenho esquemático de ensaio de toxicidade pelo MTT	48
Figura 08- Estrutura Cristalográfica do complexo entre a enzima TcGAPDH e o inibidor cumarínico Chalepina	50
Figura 09. Efeito citotóxico do mastoparano (MP) em forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> após 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação.	54
Figura 10. Histograma da produção de Espécie Reativa de Oxigênio do controle positivo (A) e do Mastoparano (B).	55
Figura 11 Análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas em epimastigotas por citometria de fluxo	56
Figura 12 - Histograma do potencial de membrana mitocondrial	57
Figura 13 - Análise do potencial de membrana em epimastigotas por citometria de fluxo	58

Figura 14. Efeito citotóxico do mastoparano (MP) em forma tripomastigota de T. Cruzi após 24h de incubação.....	59
Figura 15. Efeito do peptídeo MP sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7, ensaio com MTT.....	60
Figura 16 Acoplamento molecular do peptídeo MP na enzima TcGAPDH e a posição da chalepina (CH) obtida a partir de dados cristalográficos do complexo TcGAPDH-chalepina como parâmetro comparativo	61
Figura 17 Regiões de Interação do MP com resíduos de aminoácidos da TcGAPDH.....	62
Figura 18. Ligações inter-moleculares de H (linhas verdes) entre o peptídeo e os resíduos Cys166 e Gly245 (elipses verdes) da enzima TcGAPDH	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeitos colaterais da terapia com Benzonidazol.....	25
Tabela 2. Sequência primaria de Mastoparanos isolados do veneno da vespas <i>Polybia paulista</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Argenina
Asp	Ácido Aspártico
ANOVA	Análise de Variância
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BZN	Benzonidazol
Cys	Cisteína
CI 50	Concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GADPH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
His	Histidina
IC50	Concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas
Leu	Leucina
FL	Emissão de fluorescência
Fmoc	N-9-fluorenilmetoxycarbonil
LCC	Laboratório de Cultivo Celular
LIT	Liver Infusion Tryptose
Lys	Lisina
Ile	Isoleucina
Met	Metionina
mL	Mililitros
µL	Microlitros

MP	Mastoparano
MS	Ministério da Saúde
p	Significância estatística
PBS	Tampão <i>fosfato-salino</i>
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
Pro	Prolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
Rh	Rodamina
SBF	Soro Bovino Fetal
Ser	Serina
T.Cruzi	Trypanosoma cruzi
TcGADPH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase de T.cruzi
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
Val	Valina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Doença de Chagas.....	18
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.3 Evolução Clínica da Doença de Chagas	22
1.4 Terapia Medicamentosa da Doença de Chagas	24
1.5 Estresse Oxidativo e a Doença de Chagas.....	26
1.6 Via Glicolítica do <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Enzima GAPDH	28
1.7 Docking Molecular.....	30
1.8 Artrópodes no Brasil	31
1.9 Mastoparanos.....	32
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Peptídeo, células e substâncias utilizadas	42
4.2 Avaliação do Efeito do mastoparano (MP) sobre formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	42
4.2.1 Cultivos de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	42
4.2.2 Efeito citotóxico sobre as formas epimastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i>	43
4.3 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas	44
4.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	45
4.5 Avaliação do Efeito do peptídeo mastoparano (MP) sobre formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	46
4.6 Avaliação da toxicidade do mastoparano em células de macrófagos	47

4.7 Docking Molecular	49
4.7.1 Estrutura Tridimensional do Mastoparano.	49
4.7.2 Estrutura Cristalográfica do complexo TcGAPDH-Chalepina.....	49
4.7.3 Sítios de Ligação Mastparano - TcGAPDH.....	50
4.8 Análise Estatística	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Efeito citotóxico sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
5.2 Análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas em epimastigotas	55
5.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	57
5.4 Efeito citotóxico sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
.....	59
5.5 <i>Ensaio de Toxicidade</i>	60
5.6 Docking Molecular	61
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES.....	72
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO	91

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) denomina “doenças negligenciadas” como as enfermidades que apresentam maior ocorrência nos países em desenvolvimento. Elas correspondem a um grupo de doenças infecciosas que acomete predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis, contribui para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social, em razão principalmente do seu impacto na saúde (MOREL, 2006; BRASIL, 2010).

As doenças são consideradas negligenciadas devido à falta de investimento no desenvolvimento de novos fármacos, métodos diagnósticos, vacinas e também pela pouca eficácia dos programas de controle. Embora existam financiamentos para pesquisas relacionada a estas doenças, é inegável que uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (WHO, 2012).

As doenças tropicais negligenciadas são endêmicas em 149 países e territórios. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas. O primeiro relatório abrangente da OMS sobre o tema foi lançado em outubro de 2010, evidenciando que o assunto é ainda bastante recente no âmbito da definição de políticas públicas globais (WHO, 2010).

O Brasil tem apresentado iniciativas promissoras na tentativa de fortalecer e qualificar ações em temas considerados prioritários e apoiar atividades de pesquisa científica, tecnológica e de inovação no controle das doenças negligenciadas, entre elas, a Doença de Chagas (VILLAS BÔAS, 2007; DECIT, 2010).

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que reportou seus elementos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos, bem como seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (*T.Cruzi*) (CHAGAS, 1909). Considerada pela OMS como uma das treze principais doenças tropicais negligenciadas, tem sido um flagelo para o homem desde a antiguidade e continua a ser um problema econômico e social relevante em muitos países da

América Latina, onde a doença é endêmica (RASSI JUNIOR *et al.*, 2012). Segundo estimativas da OMS, existem no mundo aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões em risco. No Brasil, cerca de três milhões de pessoas estão infectadas e outras cinco milhões em risco (WHO, 2015; PETHERICK, 2011).

Durante décadas, a doença era relacionada a comunidades periféricas, de baixo poder aquisitivo, com condições precárias de moradia e restrita a regiões tropicais. Entretanto, a enfermidade deixou de ter barreiras territoriais e vive uma fase de globalização em consequência da crescente migração de pessoas entre os países (SHIMIZU, 2014; AFONSO *et al.*, 2012). Casos agudos têm sido registrados em diversas regiões do mundo, dentre elas, Américas (Canadá e Estados Unidos), Pacífico Ocidental (principalmente Austrália e Japão) e em países Europeus (principalmente Bélgica, França, Itália, Espanha Suíça e Reino Unido) (BEARD *et al.*, 2003; DIAZ, 2007).

Após um século de sua descoberta, a doença de Chagas continua a ser um sério problema de saúde e econômico em muitos países (WHO, 2012). No final dos anos 70, no Brasil, a área endêmica, com risco de transmissão da doença de Chagas pela presença de vetores infectados, incluía 18 estados e mais de 2,2 mil municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos (COURA e BORGES-PEREIRA, 2011).

No início, ainda sem reconhecimento da importância em termos de saúde pública, o controle da doença fazia parte, ao lado de outras doenças endêmicas, de uma Divisão de Organização Sanitária. Com a reestruturação do Ministério da Saúde em 1970, a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) englobou todas as endemias rurais, e a doença de Chagas passou a ter importância na mesma posição hierárquica de outras doenças transmitidas por vetores que já eram consideradas prioritárias, como por exemplo, a malária (BRASIL, 2010).

No período de 2000 a 2011, foram registrados mais de mil e duzentos casos de Doença de Chagas Aguda no Brasil. Durante os anos de 2012 - 2013 ocorreram 313 notificações. Muitos casos passam despercebidos, pois a notificação é obrigatória somente em casos agudos da doença. Dos infectados, 40% desenvolvem a doença sintomática e os 60% restantes se mantêm assintomáticos

por vários anos. Atualmente, tem-se observado um predomínio dos casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado que não foram notificadas (ARAUJO-JORGE, 2014).

O Nordeste brasileiro ocupa importante lugar no contexto nacional da epidemiologia da doença de Chagas, sendo considerada a segunda região com maior número de contaminações do país, perdendo apenas para a região Norte (BRASIL, 2010). O Estado do Ceará apresenta cobertura vegetal predominante de caatingas, possuindo uma vasta área rural com habitações humanas de baixa qualidade e com condições ambientais adequadas para o abrigo de triatomíneos (DIAS, 2011; CAVALCANTI, *et. al.*, 2009).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O parasita *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado classificado dentro da Ordem Kinetoplastida, desenvolve-se em insetos hematófagos da família Reduviidae, pequenos mamíferos de vida silvestre e humanos (CHAGAS, 1909; RASSI JUNIOR *et. al.*, 2010).

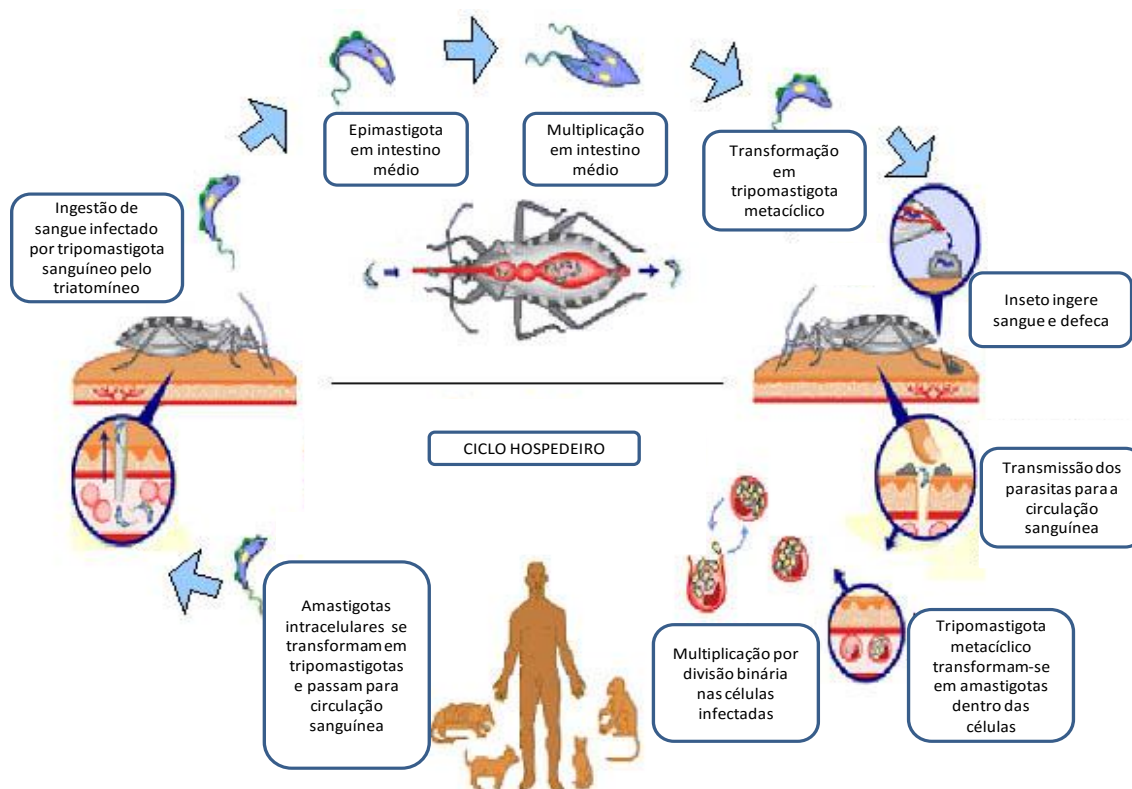
Entre as diferentes espécies de triatomíneos causadores da doença de Chagas, o *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma Pseudomaculata* podem ser considerados os principais vetores de transmissão da doença no Brasil (SILVEIRA *et al.*, 1998; DIAS *et al.*, 2001).

O ciclo biológico do *T.cruzi* envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados, assim como diferentes formas morfológicas com fisiologia muito particular. No hospedeiro invertebrado, observamos as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, enquanto que no vertebrado, encontramos a forma tripomastigota na corrente sanguínea (forma infectante) e a forma intracelular denominada amastigota (BRENNER, 1973; ARAUJO *et al.*, 2009; CLAYTON, 2010).

A principal fonte de transmissão do parasita *Trypanosoma cruzi* é pela via vetorial, que ocorre através do triatomíneo hematófago. O mecanismo de infecção ocorre no momento da picada, quando o inseto defeca na superfície do hospedeiro. O ato de coçar o local, em função de substância irritante liberada pelo barbeiro, provoca a inoculação do *T. cruzi* (forma tripomastigota metacíclicos). Com a

infecção, os parasitas são capazes de sobreviver e reproduzir-se em uma variedade de células nucleadas, incluindo macrófagos (SILVA et. al., 2007), na forma amastigota. Após vasta reprodução no interior dessas células, os protozoários tomam a forma tripomastigota e lisam a célula hospedeira, voltando para a circulação. A transmissão ocorre quando um triatomíneo se alimenta de sangue contaminado e passa para outro indivíduo, reiniciando o ciclo (figura 1) (CESTARI, 2006).

Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.



Fonte: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html> (modificado).

Outras formas de contaminação podem ocorrer por transfusão sanguínea e por vias alternativas. A aquisição da doença a partir de um doador infectado pode ocorrer em 10-20% dos casos (RASSI JR et al., 2010). Dessa forma, na década de 80, o Brasil iniciou um rigoroso controle sobre os bancos de sangue privados e públicos, como alternativa no controle da transmissão por transfusão sanguínea

(DIAS *et al*, 2002). Juntamente com a redução dos casos de transmissão por transfusão sanguínea, ocorreu também a diminuição da transmissão por via congênita (transmissão do tipo vertical da mãe chagásica para o filho durante a gravidez), devido a diagnósticos e programas de tratamento para mulheres em idades férteis (DIAS e NETO, 2011).

Entre as vias alternativas também estão a transmissão oral, por transplantes de órgãos, acidental em laboratórios e outras excepcionais (via sexual). Com as principais vias de transmissão sob controle no Brasil, as demais foram, de certa forma, negligenciadas por não serem consideradas em programas governamentais (DIAS e NETO, 2011). Portanto, surtos regionais de infecção aguda ainda são detectados no Brasil com provável transmissão por via oral. Durante os anos de 2010 a 2013 ocorreram 476 notificações de casos de doença de Chagas aguda decorrente da transmissão por via oral. Em humanos, a transmissão oral acontece de forma esporádica e circunstancial por ingestão de alimentos contaminados pelo parasito, tais como caldo de cana, polpa de açaí e sopas. Geralmente, são encontrados vetores ou reservatórios infectados nas imediações da área de produção, manuseio ou utilização dos alimentos contaminados (ARAÚJO-JORGE, 2014). No estado do Ceará, em 2006 foram notificados oito casos de doença de Chagas Aguda ocasionados por transmissão oral no município de Redenção (CAVALCANTI, *et. al.*, 2009). Essa via é de difícil prevenção devido à aleatoriedade de seu acontecimento (DIAS, NETO e LUNA, 2011). Mesmo com diferentes formas de evolução, a doença possui forma evolução clínica similar.

1.3 Evolução Clínica da Doença de Chagas

A Doença de Chagas é uma entidade clínica em que são observadas três fases distintas (fase aguda, fase de latência e fase crônica). A fase aguda ocorre logo após o período de incubação. Nessa fase, que dura em média dois meses, a ausência ou o tratamento ineficaz pode determinar o aparecimento de uma parasitemia intensa, que persiste por cerca de quinze a trinta dias, de acordo com algumas características intrínsecas do paciente, associadas às características biológicas da cepa do protozoário. A partir da intensidade de parasitemia, o quadro clínico pode ir de uma síndrome clínica silenciosa e assintomática até uma síndrome

multifatorial com reação local, febre persistente, cefaléia podendo também ocorrer linfadenopatia e hepato-esplenomegalia (COURA, 2007).

Quando a transmissão do *trypanosoma* é a conjuntiva ocular, pode surgir um edema bipalpebral, unilateral, denominado sinal de Romanã. Quando o parasita penetra por outros locais da superfície corporal, a lesão produzida recebe o nome de "chagoma de inoculação". Com frequência, a fase aguda passa despercebida, pois seus sintomas podem confundir-se com os de diversas outras infecções. Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca podem estar associados e causar óbito (LESCURE *et al.*, 2010).

Após o período agudo (fase que dura cerca de 4 a 8 semanas), os indivíduos acometidos que não apresentaram sintomas progridem para a denominada fase de latência ou fase crônica indeterminada, quando a parasitemia decresce, porém, os tecidos continuam infectados. Cerca de 70-80% desses pacientes não apresentam sintomas durante essa fase (eletrocardiograma normal, esôfago e cólon também normais), mas apresentam positividade para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, permanecendo dessa forma até o final da vida (RASSI JR *et al.*, 2010).

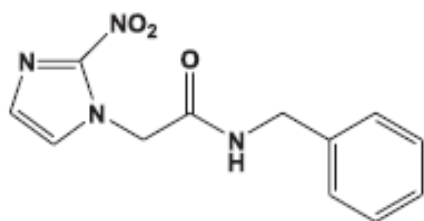
As manifestações crônicas da doença de Chagas aparecem mais tarde, na vida adulta, 20 a 40 anos depois da infecção original, onde são identificáveis sintomas de comprometimento cardíaco e digestivo. A cardiomiopatia da doença é caracterizada por processo inflamatório crônico ocasionando danos como arritmias, falência do coração e tromboembolismo (BERN, 2011; COURA e BORGES-PEREIRA, 2010), de forma que ocorre miocardite progressiva com o comprometimento da função contrátil do músculo cardíaco.

Na forma digestiva, as manifestações clínicas são devidas à dilatação do trato gastrointestinal (megacólon e megaesôfago). Há, nestas fases, gradativa redução da qualidade de vida e da capacidade de trabalho dos doentes, que passam a necessitar de atenção médica constante (COURA, 2007). Não é uma doença fatal nos estágios iniciais; no entanto, no Brasil, a cardiopatia da doença de Chagas é uma importante causa de morte entre adultos de 30 a 60 anos e uma grande causa de implante de marcapasso cardíaco e de transplante de coração. (ABE *et al.* 2002; PEDRA, *et al.*, 2011; ARAÚJO-JORGE, 2014).

1.4 Terapia Medicamentosa da Doença de Chagas

Após a descoberta da doença de Chagas, até o momento, nenhum novo fármaco foi desenvolvido para patologia e o tratamento utilizado é direcionado para a sintomatologia e não para a etiologia da doença. Assim, do ponto de vista sintomático, procura-se amenizar as diversas manifestações clínicas. Do ponto de vista etiológico, somente um fármaco está disponível para uso em humanos no Brasil, o Benzonidazol (BZN) (Figura 2) (VIOTTI *et al.*, 2009).

Figura 2. Estrutura Química do Benzonidazol



Fonte: ANDRADE, 2013 (Modificado)

O mecanismo de ação do BZN, um derivado nitro-heterocíclico, nos *trypanosomas* ainda não se encontra totalmente elucidado, porém duas hipóteses foram propostas. A primeira seria através de reações bioquímicas que levam à ruptura do DNA do parasita. A segunda resultou da observação que a ativação do fármaco poderia levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (WILKINSON e KELLY, 2009).

A ação do BZN na formação de ERO seria através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofilicos. O grupo nitro (NO_2) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH_2), pela ação de enzimas do tipo nitroreductase. Este processo (iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 reductase) leva à formação de um intermediário nitro radicalar ($\text{R-NO}^{\cdot-}$), com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH) (DIAS *et al.*, 2009).

Segundo evidências, o BZN não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (DIAS *et al.*, 2009). O efeito tripanocida aconteceria através do radical nitro, com a formação de ligações covalentes com macromoléculas do parasita (DIAZ DE TORANZO *et al.*, 1988). Alguns estudos descrevem ainda que o BZN aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de IFN- γ (ROMANHA *et al.*, 2002).

Outro trabalho que tentou explicar o mecanismo de ação do BZN foi realizado por Turrens *et al.* (1996), que mostraram que o BZN é um potente inibidor da enzima NADH-fumarato redutase, importante para a produção de energia nos tripanossomatídeos e presente em todas as fases evolutivas do *T. cruzi*. Nesse estudo, foi observada uma forte correlação entre a inibição do crescimento de formas epimastigostas em cultura celular e a inibição dessa enzima *in vitro*.

A baixa seletividade de vias bioquímicas deste medicamento acaba afetando também o paciente que recebe o tratamento, ocasionando efeitos adversos durante a terapia (Tabela 1) (CANÇADO, 2002). Na fase aguda da doença, o índice de cura dos pacientes que fazem uso do benzonidazol tem sido, em média, de 75% (INBEQMEDI, 2014). Entretanto, o tratamento na infecção crônica ainda permanece controverso e com poucos estudos longitudinais que comprovem o benefício do uso do medicamento (CORTEZ, *et al.*, 2012; ANDRADE, 2013; FIOCRUZ, 2015).

Tabela 1. Efeitos colaterais da terapia com Benzonidazol.

Efeitos Colaterais	Benzonidazol
Alterações da Pele (Hipersensibilidade)	25-30%
Distúrbios gastrointestinais	10-40%
Distúrbios do Sono	10-20%
Polineuropatias (Parestesias e Polineurite)	27%
Anorexia e Perda Ponderal	5-40%
Cefaléias	2-8%
Mialgias ou Artralgias	5-30%
Edema e/ou Febre	1-9%

Dados são em % de doentes.

Fonte: CORTEZ, *et al.*, 2012 (modificado).

Do ponto de vista social e econômico, o controle da transmissão da doença de Chagas é altamente impactante, não somente por possibilitar a eliminação de um agravo de grande importância humana, mas também por representar enorme retorno financeiro aos investimentos realizados pelo Ministério da Saúde (MS) (SILVEIRA e VINHAES, 1998; DIAS, 2001). O MS disponibiliza gratuitamente aos estados o tratamento específico para todos os pacientes identificados com a doença ou portadores. Apesar da atual situação de controle da transmissão vetorial, existem ainda desafios relacionados ao diagnóstico e atenção aos portadores da infecção.

Além da citotoxicidade característica, diversas cepas de *T. cruzi* vêm apresentando resistência a estas drogas, bem como o BZN possui limitada ação na fase crônica da doença. Tudo isso requer, portanto, a necessidade de um novo arsenal quimioterápico (MARIN-NETO, et al, 2009).

A existência de cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes às drogas administradas no tratamento da doença de Chagas, as reações adversas e a ineficácia das terapias atuais, justificam a importância de pesquisas relacionadas a esta temática. Dentro deste contexto, as toxinas de artrópodes podem conter substâncias bioativas com potencial para serem usadas como modelos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas.

1.5 Estresse Oxidativo e a Doença de Chagas

O oxigênio (O_2) é um elemento de defesa do nosso organismo, indispensável e absolutamente necessário à respiração celular (PEREIRA e PEREIRA, 2012). Efeitos tóxicos do oxigênio, sobre componentes biológicos, já eram conhecidos no final de século XIX, tornando-se objeto de intensa investigação científica. As alterações na respiração celular podem formar Radicais Livres (RL), destruindo células do organismo (HALLIWELI, 2000).

Embora o oxigênio desempenhe um papel fundamental no processo de fosforilação oxidativa, permitindo ao nosso organismo utilizar a energia proveniente de nutrientes (como carboidratos, lipídios e proteínas) com maior eficiência, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial é transformada em espécies reativas de oxigênio (ERO) (JI, 1999; CHANCE, 1979). As ERO são derivadas do oxigênio

molecular, são altamente instáveis e reagem rapidamente com outros radicais livres e macromoléculas em reações em cadeia para gerarem o aumento de oxidantes nocivos (KIRKINEZOS e MORAES, 2001). Acredita-se que os efeitos tóxicos das ERO variam em função da quantidade e da força oxidante (ZACKS et al., 2005). O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o oxigênio singleto (1O_2) e o radical hidroxilo ($HO\cdot$) podem ser considerados como as principais espécies reativas de oxigênio (PEREIRA e PEREIRA, 2012).

Em células aeróbicas saudáveis, as espécies são produzidas naturalmente como um subproduto de diferentes vias metabólicas como, por exemplo, a fosforilação oxidativa. No entanto, essas espécies podem ser induzidas sob algumas condições de estresse, especialmente na exposição a oxidantes ambientais e certas drogas/substâncias que levam ao estresse oxidativo (JI, 1999; MENEHINI, 1987).

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados. Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas como o NADH, equilíbrio esse mantido por enzimas à custa de energia metabólica. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lípidos e o DNA (GUPTA et al., 2009; FRANCISCO, 2011).

Foi evidenciado que a exposição de células a um mesmo agente tóxico pode desencadear injúria celular e esta pode ocasionar uma variedade de respostas de adaptação, reparação, proliferação ou morte celular, a depender da dose e do tempo de exposição ao agente indutor (DYPBUKT, et al., 1994; BONFOCO et al., 1995).

Durante o ciclo de vida, o *T. cruzi* está exposto a diferentes espécies reativas geradas pelo metabolismo aeróbico do próprio parasita, à resposta imune do hospedeiro e à ERO liberadas pelos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas. As ERO contribuem para a desestabilização da membrana celular do parasita, inativação de enzimas essenciais, mutagênese e danos ao DNA. Assim, quanto maior a quantidade de radical livre gerado, maior será o dano causado pelo

estresse oxidativo no *T. cruzi* (TURRENS, 2004). Foi observado que o *T. cruzi* possui diferentes mecanismos de detoxificação para manter a homeostase redox, a maioria deles baseados em mecanismos que envolvem atividade enzimáticas importantes do parasita (PEREIRA, 2003).

Portanto, um melhor entendimento dos mecanismos de defesa do *T. cruzi* contra o estresse oxidativo, bem como o conhecimento baseado das atividades enzimáticas das vias metabólicas do parasita podem ser estratégias eficientes na busca por novos alvos terapêuticos.

1.6 Via Glicolítica do *Trypanosoma Cruzi* e a Enzima *GAPDH*

Recentemente, despertou interesse na comunidade científica a identificação de alvos enzimáticos vitais para os parasitas como estratégia na busca de novas terapêuticas. Particularmente, na família Trypanosomatidae, um dos alvos enzimáticos mais estudados, visando a quimioterapia, são as enzimas da via glicolítica (MELOS e ECHEVARRIA, 2012).

A via glicolítica é a principal forma de obtenção de energia de tripanossomatídeos. A morte do parasita por inibição de uma enzima ou via metabólica, essencial para sua sobrevivência e não-essencial para o hospedeiro, requer a exploração das diferenças entre essas vias ou enzimas. Isto é, a exploração quantitativa dessas diferenças no metabolismo e na seleção de vias ou enzimas, que exerçam um alto nível de controle metabólico no parasito e um baixo nível de controle metabólico no hospedeiro, são fatores que determinam a especificidade e conseqüentemente a eficácia do potencial inibitório de uma substância com potencial terapêutico (URBINA, 2010).

Os tripanossomatídeos são dependentes da glicólise para a produção de ATP, sendo esse mecanismo realizado por diferentes enzimas de diferentes vias metabólicas. Como muitas enzimas glicolíticas, as presentes no metabolismo oxidativo dos parasitas apresentam características próprias, sendo consideradas potenciais alvos para novos agentes quimioterápicos. Desta forma, a maioria dos estudos descritos na literatura envolve as enzimas frutose-1,6-difosfato aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato

quinase, piruvato quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase (MELOS e ECHEVARRIA, 2012; PROKOPCZYK, *et al.*, 2014).

Dentre as enzimas da via glicolítica dos tripanossomatídeos, a que vem despertando maior interesse é a gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GADPH) (VERLINDE *et al.*, 2001). Esta enzima catalisa a fosforilação oxidativa de D-gliceraldeido-3-fosfato em 1,3- bisfosfoglicerato na presença de NAD⁺ e fosfato inorgânico (BAKKER *et al.*, 2000; LADAME *et al.*, 2003).

A GAPDH é um alvo de grande interesse para o desenvolvimento de inibidores do parasita causador da Doença de Chagas pelo fato de apresentar algumas características específicas, tais como:

1. Apresentar uma estrutura tridimensional (3D), o que permite estudos estruturais detalhados do seu sítio ativo e a investigação do modo de interação do ligante (LADAME *et al.*, 2003);
2. Ser uma enzima de glicólise que tem grande importância no controle cinético do fluxo glicolítico (BAKKER *et al.*, 1999).

A alta dependência da via glicolítica para a obtenção de energia pelos tripanossomatídeos, a organização particular das enzimas dessa via no glicossomo e a ocorrência de características únicas, tanto estruturais quanto no mecanismo de muitas enzimas envolvidas na glicólise, oferecem uma série de oportunidades para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Esse conjunto de características explica o motivo pelo qual as enzimas da via glicolítica são alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos (REIS *et al.*, 2013).

Estudos experimentais e de simulação computacional do controle do fluxo metabólico na via glicolítica tem demonstrado que os alvos preferenciais para inibição são o transportador de glicose e as enzimas aldolase e GAPDH. Assim, desde a elucidação da estrutura da enzima GAPDH do *Trypanosoma cruzi* (TcGAPDH), foram desenvolvidos diversos estudos na busca por inibidores em produtos naturais (TOMAZELA, 2000) e em estruturas de complexos proteína-ligante (PAVÃO *et al.*, 2002). Um exemplo é o complexo da enzima com o produto

natural chalepina, uma cumarina extraída da árvore de mata atlântica *Pilocarpus spicatus*, elucidado por cristalografia de raios-X. Com base nesta estrutura, diversos análogos foram planejados e sintetizados buscando aperfeiçoar a afinidade e especificidade dos ligantes, maximizando assim seu potencial farmacológico (CASTILHO, 2004).

1.7 Docking Molecular

A busca por moléculas que possam se ligar a alvos de interesse biológico é importante no processo de descoberta de novas substância com potencial terapêutico. Nesse contexto, estudos utilizando tecnologia computacional se mostram favoráveis para comunidade científica (FEINSTEIN e BRYLINSK, 2015).

Se uma estrutura tridimensional do alvo em estudo encontra-se disponível, a simulação através de docking molecular pode ser uma ferramenta muito útil no estudo e descoberta de novos fármacos (PIERRI *et al.*, 2010). Por docking molecular pode-se estudar complexos intermoleculares formados, por exemplo, entre enzimas, receptores e DNA. Essa ferramenta é amplamente utilizada no estudo das interações entre inibidores e suas respectivas enzimas (LEACH, 2001).

Nessa metodologia computacional, são investigadas as possíveis orientações que determinada molécula (ligante) assume no interior do sítio ativo de uma proteína (alvo). Assim, o entendimento de como essa interação entre o alvo e o ligante acontece se torna fundamental, aliando características de alta seletividade/especificidade e propriedades farmacocinéticas adequadas (CASTILHO 2004).

O *docking* molecular consiste em um método que tem por objetivo encontrar a orientação e conformação mais provável de um ligante ancorado em um determinado alvo, permitindo a predição da estrutura espacial do complexo receptor-ligante e sua respectiva energia livre de formação (KITCHEN *et al.*, 2004; PYRKOV *et al.*, 2010). Os resultados são obtidos basicamente através de uma análise de uma amostragem conformacional em que diversas conformações ancoradas são exploradas para tentar prever uma potencialmente correta (PIERRI *et al.*, 2010). O método, em geral, envolve uma função de energia contendo parâmetros

eletrostáticos, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, os quais geram modelos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista escore de energia (SILVA, 2008; MARSHALL, 2004).

Existem diversos softwares voltados ao ensino de química que auxiliam na compreensão de conceitos químicos, dentre eles o software Avogadro. Trata-se de um programa computacional gratuito, com interface de fácil visualização em 3D, o que possibilita a abordagem de diversos conceitos químicos como a geometria molecular, ângulos de ligação, cálculo de energia, massa molecular, propriedades periódicas, etc (FEINSTEIN e BRYLINSK, 2015).

Estas metodologias tem, portanto, criado perspectivas promissoras de descoberta de novas alternativas quimioterápicas para o tratamento da doença de Chagas.

1.8 Artrópodes no Brasil

As substâncias com atividade biológica derivadas de produtos animais são focos atuais da ciência na busca de novos medicamentos e aplicações em biotecnologia (HARVEY, *et al.*, 1998; MORTARI, *et al.*, 2007), pois possuem estruturas com grande diversidade química, especificidade bioquímica, além de outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novas drogas (ALTMANN, 2001).

A pesquisa por novos fármacos cresceu bastante nos últimos anos. Dessa forma, os venenos de invertebrados têm apresentado grande interesse como fonte de substâncias bioativas (MORTARI, *et al.*, 2007). Dentre os invertebrados existentes, cerca de 1,5 milhões de espécies são de artrópodes (FREITAS *et al.*, 2006).

Dentre a grande diversidade e abundância dos artrópodes, os insetos podem ser considerados um dos grupos de animais e, juntamente com os crustáceos e outros artrópodes, compõem cerca de 70% das espécies existentes no planeta, sendo que a Classe *Insecta*, sozinha, possui diversidade maior que qualquer outro animal terrestre (GARCIA, 1999; LIMA, de LIMA, PREZOTO, 2000).

A ordem *Hymenoptera*, que pertence a classe insecta, é formada por milhões de espécies e possui interesse clínico significativo, uma vez que muitos envenenamentos de importância médica são causados por membros pertencentes às famílias *Apidae* (abelhas), *Formicidae* (formigas) e *Vespidae* (vespas) (STEEN *et al.*, 2005).

Pesquisas sobre a estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação do veneno total e/ou toxinas isoladas do veneno de *Hymenoptera* evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista médico, farmacológico e imunológico (OLIVEIRA, 2000; LORENZI, 2002). Assim, esses venenos vêm despertando grande interesse nos pesquisadores, principalmente nas áreas médica e farmacológica.

A peçonha de vespas sociais, formada por uma variedade de compostos que foram desenvolvidos ao longo do processo evolutivo, é utilizada efetivamente para a auto-defesa, captura e/ou imobilização das presas, com diversas ações farmacológicas (HABERMANN, 1972; NAKAJIMA *et al.*, 1985; MORTARI *et al.*, 2005; 2007).

Peçonhas das famílias *Apidae* (abelhas) e *Vespidae* (vespas) são constituídas de peptídeos, proteínas e amins biogênicas (EDERY, *et al.*, 1978; GRIESBACKER, *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2004). Os peptídeos são classificados segundo suas atividades biológicas e estruturas moleculares (NAKAJIMA *et al.*, 1985).

1.9 Mastoparanos

Os mastoparanos, a classe mais amplamente descrita de peptídeos isolados a partir da peçonha de diferentes espécies de vespas, foram assim denominados devido ao seu primeiro alvo reconhecido, os mastócitos (HIRAI *et al.*, 1979a). São peptídeos ricos em lisina e desempenham diversas funções biológicas, dentre elas a liberação de mediadores através da ativação dos receptores de proteína-G (PERIANIN e SNYDERMAN, 1989; HIGASHIJIMA e ROSS, 1991), a estimulação da fosfolipase A₂ e C, a mobilização de Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático (NAKAJIMA *et al.*, 1986), o envolvimento na morte celular por necrose ou apoptose (PERIANIN e SNYDERMAN, 1989) e a atividade antimicrobiana (KONNO *et al.*,

2001). Estudos realizados com diversos tipos de mastoparanos mostraram que alguns peptídeos possuem atividade hemolítica baixa, porém atividade antibiótica elevada (SOUZA, 2006).

Diversos estudos mostraram que os mastoparanos interagem com membranas biológicas naturais e artificiais, assumindo uma conformação em hélice- α anfipática, podendo causar um aumento na permeabilidade, sendo esta a causa primária do efeito de liberação de mediadores da ativação celular (NAKAJIMA *et al.*, 1986; MELLOR e SANSOM, 1990; SCHWARZ e BLOCHMANN, 1993; DANILENKO, *et al.*, 1993; MATSUZAKI, *et al.* 1996).

A necessidade de se compreender o mecanismo de ação de peptídeos, como os mastoparanos, abriu um vasto campo para pesquisas sobre as estruturas e funções desses compostos. Muitos autores afirmam que a estrutura interfere fortemente na intensidade e/ou tipo de atividade biológica dos peptídeos biologicamente ativos. Sendo assim, suas estruturas devem ser determinadas, não somente para explicar suas atividades biológicas, mas também para favorecer o desenvolvimento de novas drogas (KYOGOKU, *et al.*, 2003).

Hirai, *et al.* (1979b), identificaram e caracterizaram o primeiro mastoparano a partir do veneno da vespa social *Vespula lewisii*. Este peptídeo, composto basicamente de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, foi o primeiro exemplo de peptídeo desgranulador de mastócitos isolado do veneno de vespas. Konno, *et al.* (2000) isolaram o Eumenine Mastoparano-AF da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, que difere dos demais mastoparanos descritos pelo posicionamento distinto de lisina. Este peptídeo foi considerado como o principal componente peptídico do veneno desta vespa, com atividades biológicas similares às dos mastoparanos clássicos.

Estruturalmente, os peptídeos de vespas apresentam-se em conformação α -hélice, possuem na sua sequência primária 10 a 14 resíduos de aminoácidos (NAKAJIMA *et al.*, 1985). São ricos em aminoácidos hidrofóbicos como leucina, isoleucina, alanina, assim como apresentam algumas lisinas em suas seqüências primárias (NAKAJIMA *et al.*, 1986).

Embora as sequências de aminoácidos destes peptídeos sejam relativamente conservadas, substituições de alguns resíduos parecem alterar as atividades biológicas destes peptídeos, demonstrando ser esta uma interessante base para estudos futuros utilizando aplicações farmacológicas (MURATA *et al.*, 2006; CEROVSKY *et al.*, 2008).

No trabalho realizado por Souza *et al.* (2004) e Dias (2011), foi proposto um estudo de caracterização estrutural e funcional de alguns representantes da classe dos mastoparanos. Assim, foram identificadas diferentes sequências de aminoácidos do peptídeo mastoparano isolado da espécie de vespa social *Polybia Paulista*, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência primária de Mastoparanos isolados do veneno da vespa *Polybia Paulista*.

Peptídeos Sequenciados do Veneno de <i>P.Paulista</i>														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
I	D	W	K	K	L	L	D	A	A	K	Q	I	L	Souza <i>et al.</i> , 2004.
I	D	W	L	K	L	G	K	M	V	M	D	V	L	Souza <i>et al.</i> , 2004.
I	N	W	L	K	L	G	K	M	V	I	D	A	L	Souza <i>et al.</i> , 2004.
I/L	D	W	L	K/Q	L	R	V	I	S	V	I	D	I/L	Dias, 2011.
I/L	N	W	H	D	I	A	I	K/Q	N	I	D	A	I/L	Dias, 2011.
I/L	D	W	L	K/Q	L	K/Q	M	V	M					Dias, 2011.

Fonte: SOUZA *et al.*, (2004); DIAS, 2011 (Modificado).

Nesse sentido, estudos científicos com sequências de aminoácidos vem sendo realizados na tentativa de novas buscas de substância potencialmente ativas e com possível atividade biológica. A busca por terapias mais eficientes para as

doenças que acometem a humanidade se torna foco de comercialização de produtos farmacêuticos de origem natural e, conseqüentemente, intensifica o interesse na área científica (CASSÉ, 2014).

Venenos de invertebrados também são promissores na pesquisa de novos fármacos. A ziconotida (Prialt®), por exemplo, um peptídeo sintético com ação analgésica usado no tratamento da dor crônica, foi produzida a partir do peptídeo ω -conotoxina MVIIA, isolado do veneno do molusco *Conus magus* (MILJANICH, 2004).

Orivel *et al.*, (2001) e Jonhson *et al.*, (2010) encontraram ação antibacteriana no veneno de formigas *Pachycondyla goeldii*, *Myrmecia pilosula* e *Dinoponera australis*, sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além dos efeitos de venenos totais, vários peptídeos antimicrobianos já foram isolados de venenos de insetos (MONINCOVÁ *et al.*, 2010; ČUJOVÁ *et al.*, 2014). Shen *et al.*, (2010) e Mendes *et al.*, (2004) observaram em seus estudos a ação dos peptídeo isolados da vespa *Pteromalus puparum* e *Agelaia pallipes* contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Previamente, foi identificada ação antifúngica do peptídeo denominado defensina-símile isolado da vespa *Nasonia vitripennis* (YE *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2010). Os peptídeos polybia-MPI e polybia-CP, sintetizados a partir do veneno da vespa *Polybia paulista*, possuem uma potente atividade antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis* (WANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). Essa mesma espécie de vespa também foram isolados outros dois peptídeos com atividade antibacteriana, denominados Polybina I e II (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Estruturalmente, diversos peptídeos antimicrobianos apresentam atividade *in vitro* contra espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* (RANGEL, *et.al.*, 2011; DEOLINDO *et al.*, 2010; ADADE *et al.*, 2011). Partindo dos resultados prévios a respeito do efeito biológico dos peptídeos isolados de venenos vespídeos, assim como o escasso arsenal terapêutico existente no Brasil, onde o único medicamento utilizado para o controle e evolução da Doença de Chagas é o Benzonidazol, o qual apresenta limitações devido à sua alta toxicidade e eficácia limitada, tornou-se importante a busca por novas substâncias bioativas. Nesse contexto, nosso estudo teve o propósito de investigar a ação antiparasitária do peptídeo mastoparano nas

formas epimastigota e tripomastigota do parasita *Trypanosoma cruzi* cepa Y, bem como estudar o provável mecanismo de ação.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As doenças parasitárias necessitam de fundamental atenção, tanto devido ao aumento significativo da resistência dos parasitos aos agentes terapêuticos disponíveis, como ao fato de serem comumente classificadas como doenças negligenciadas possuindo assim pouco incentivo para a pesquisa clínica e para o desenvolvimento tecnológico (CANÇADO, 2002). A Doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública devido à terapia inadequada e eficácia limitada, uma vez que somente o Benzonidazol é utilizado para o tratamento da doença no Brasil (COURA *et al.*, 1997; MCKERROW *et al.*, 2009).

Os produtos naturais e seus derivados tem sido tradicionalmente a fonte mais comum na obtenção de substâncias biologicamente ativas (ALTMANN, 2001; CLARDY e WALSH, 2004; KIRKPATRICK, 2002).

Dentro deste contexto, substâncias bioativas de origem animal podem servir de modelos para serem utilizadas como futuras drogas na terapêutica. Os peptídeos isolados têm despertado interesse científico como fonte potencial de substâncias bioativas. Assim, o presente trabalho propõe estudar o efeito do Mastoparano, peptídeo isolado do veneno da vespa *Polybia Paulista*, sobre formas do ciclo evolutivo do *T. cruzi*, bem como investigar o provável mecanismo envolvido na atividade tripanocida.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do peptídeo mastoparano (MP) isolado do veneno da vespa *Polybia paulista* sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seu possível mecanismo de ação.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citotóxico do mastoparano sobre formas epimastigota e tripomastigota de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Verificar a produção de espécie reativa de oxigênio em forma epimastigota;
- Avaliar a possível alteração do potencial de membrana mitocondrial em formas epimastigota;
- Avaliar a toxicidade in vitro do peptídeo em estudo sobre células de macrófagos RAW 264.7;
- Verificar a interação do mastoparano com a enzima TcGAPDH por meio de ensaios *In silico*, identificando assim o modo de ligação mais provável e as interações do ligante com a enzima;

*MATERIAIS E
MÉTODOS*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará.

4.1 Peptídeo, células e substâncias utilizadas

O peptídeo Mastoparano (MP) da vespa *Polybia paulista* foi sintetizado, purificado no instituto de biociência pela Profa. Dra. Bibiana Monson de Souza da Universidade Estadual Paulista - UNESP e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mario - UNESP. A síntese do MP foi realizada através do método manual em fase sólida (MERRIFIELD, 1986), utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxicarbonil, também conhecida como estratégia Fmoc.

As formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* foram obtidas do laboratório de Bioquímica do instituto de Química da USP e cultivadas no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) da Universidade Federal do Ceará.

As células Raw 264.7 foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As substâncias e sais utilizados para realização do estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich.

4.2 Avaliação do efeito do mastoparano (MP) sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

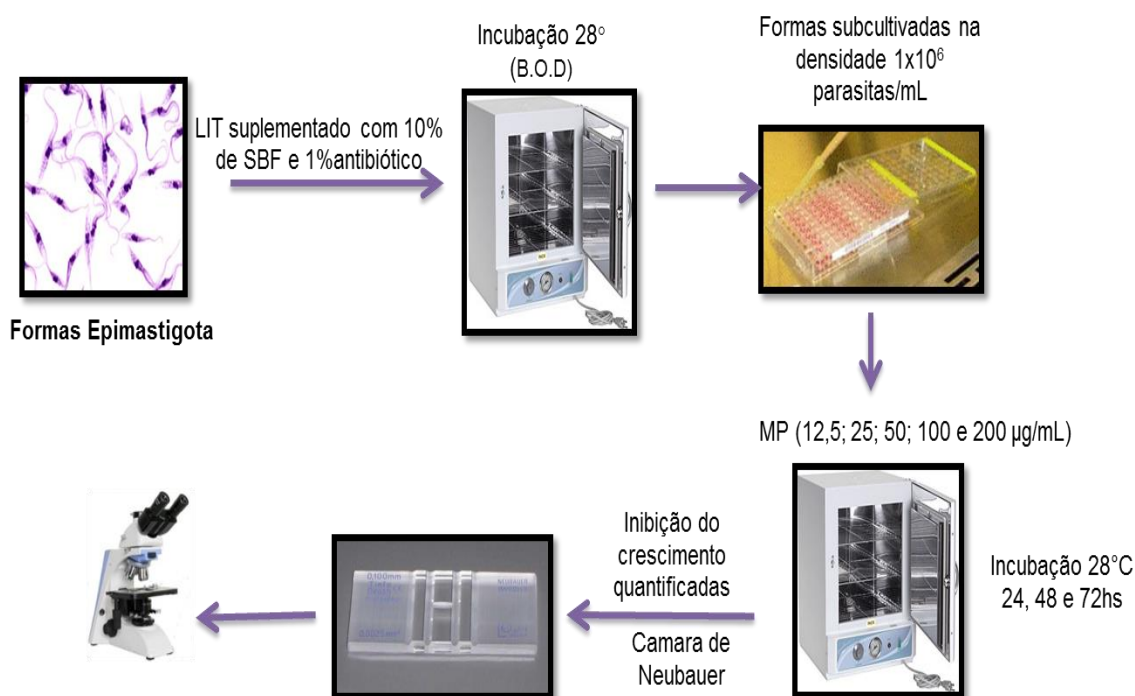
4.2.1 Cultivos de formas epimastigotas de *T. cruzi*

As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de solução de antibióticos (penicilina/estreptomicina, Sigma, Brasil), de acordo com Camargo (1964). Os parasitos foram mantidos em incubadora B.O.D (Fanem, Brasil) a 28°C. Os parasitas utilizados para os experimentos foram provenientes de culturas da fase exponencial, determinada através da realização de uma curva de crescimento por contagem diária dos parasitas em câmara de Neubauer, após diluição em PBS.

4.2.2 Efeito citotóxico sobre as formas epimastigotas de cepa Y *T. cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram subcultivadas, em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^6 parasitas/mL e incubadas a 28°C em estufa de B.O.D. (Fanem, Brasil) em meio LIT enriquecido com 1% de antibióticos e 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). As alíquotas de diferentes concentrações do MP (12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL) foram adicionadas à suspensão de parasitos. A placa foi incubada por 24, 48 e 72 horas nas condições de cultivo. Neste ensaio foi utilizado como controle negativo os parasitos tratados com PBS estéril. O movimento dos parasitos foi observado em microscópio invertido (x100) (ABE, 2002; GONÇALVES *et al.* 2002), sendo a inibição do crescimento determinada por quantificação em câmara de Neubauer. As culturas sem tratamento foram consideradas 100% de crescimento e a Cl_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada de acordo com o modelo PROBIT de análise de regressão. (Figura 03).

Figura 03- Desenho esquemático dos ensaios de citotoxicidade em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



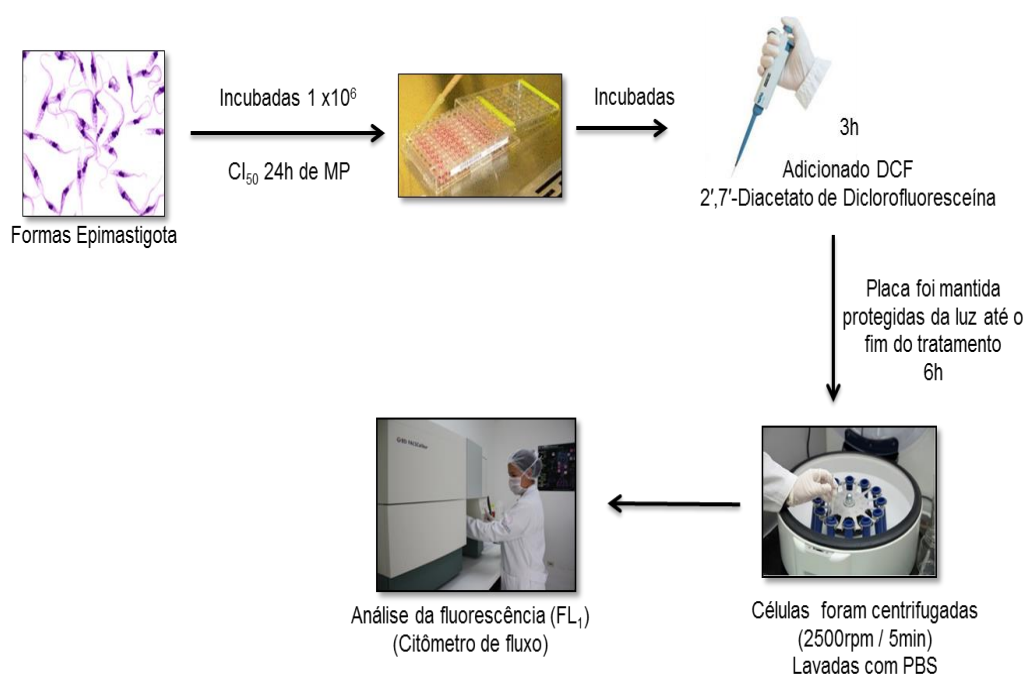
Fonte: Autora.

4.3 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas

Com o intuito de estudar a participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) no efeito citotóxico do mastoparano sobre formas epimastigota de *T. cruzi*, foi utilizado como indicador da geração de ERO, a substância 2',7'-Diacetato de Diclorofluoresceína (DCF), que apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência, sendo utilizada como marcador para o estresse oxidativo da célula.

No estudo, placas de 24 poços foram incubadas 1×10^6 células/mL com a CI_{50} de 24 horas de MP (102 $\mu\text{g/mL}$). Após 3 horas de incubação, adicionou-se DCF (2 mM). A placa foi mantida protegida da luz até o fim do período de tratamento (6 horas). Em seguida, as células foram coletadas, centrifugadas (2500 rpm por 5 minutos) e lavadas com PBS. Por fim, o pellet foi resuspendido e analisado em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), para análise da emissão de fluorescência (FL_1) (Figura 04). Como controle positivo, foi usado o terc-butilhidroperóxido (25 μM), um indutor do estresse oxidativo.

Figura 04 – Desenho esquemático da análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio



Fonte: Autora.

A intensidade de fluorescência emitida foi estimada pela média geométrica da intensidade de fluorescência nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi feita a partir da intensidade relativa de fluorescência, determinada usando a fórmula (Intensidade Relativa de fluorescência = Fluorescência teste / Média de fluorescência CT), aonde a Fluorescência teste foi determinada pela intensidade apresentada pelo MP e a fluorescência CT determinada pelo controle negativo (PBS).

4.4. Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

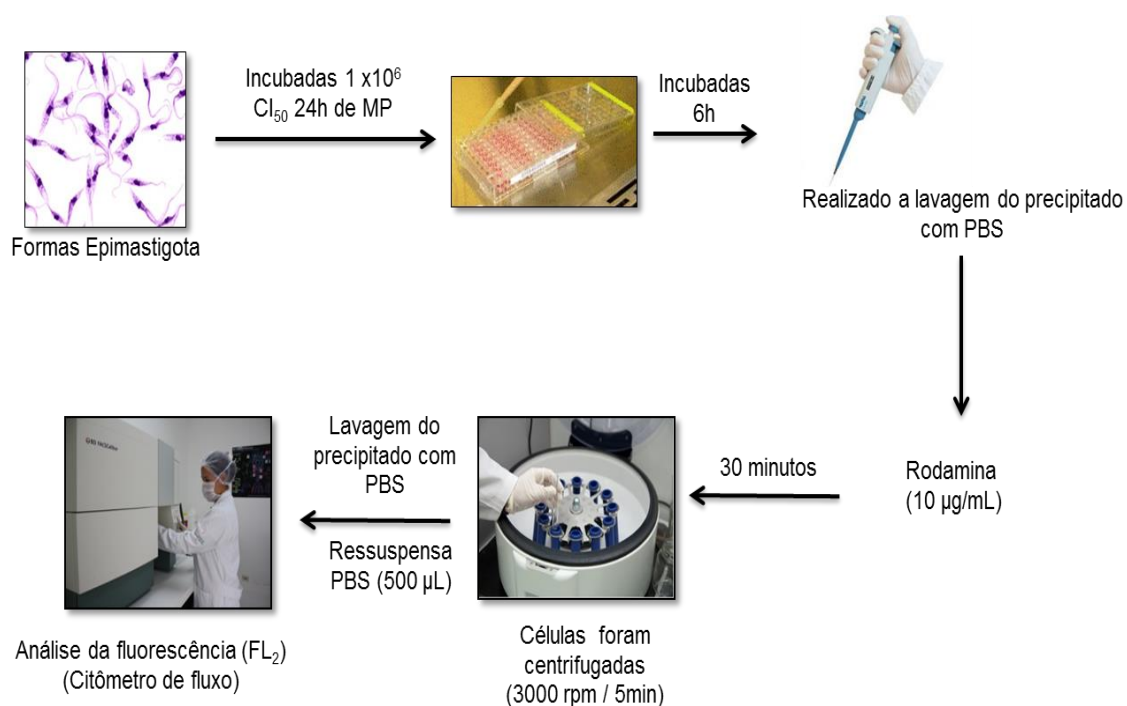
Na busca de verificar o efeito de MP sobre o potencial de membrana mitocondrial das formas epimastigotas, foi realizado o ensaio com rodamina 123 por meio de citometria de fluxo. A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior dessas organelas, emitindo uma fluorescência vermelha (FL₂). Alterações ao nível da membrana mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectadas em ensaios de citometria por meio da diminuição da vermelha mitocondrial, iniciando a redução do acúmulo de Rh-123 nessa organela (JOHNSON *et al.*, 1980).

4.4.1 Protocolo Experimental

As formas epimastigotas na concentração de 1×10^6 células/mL foram incubadas com a CI₅₀ de MP e PBS (controle negativo) durante 24 horas em placas de 24 poços. Em seguida as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. O precipitado obtido foi lavado 2 vezes com PBS e ressuspensão em 490 µL de PBS. As suspensões foram tratadas com rodamina (na concentração final de 10 µg/mL) por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram centrifugadas, lavadas 2 vezes, ressuspensas em 500 µL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) para contagem de células marcadas com Rh-123 (Figura 5) (DE LIMA, *et al.*, 2005).

A intensidade de fluorescência e análise estatística para o experimento foram realizadas de maneira semelhante a descrita para a Produção de Espécie Reativa.

Figura 05 – Desenho esquemático do protocolo experimental do potencial transmembrânico mitocontrial



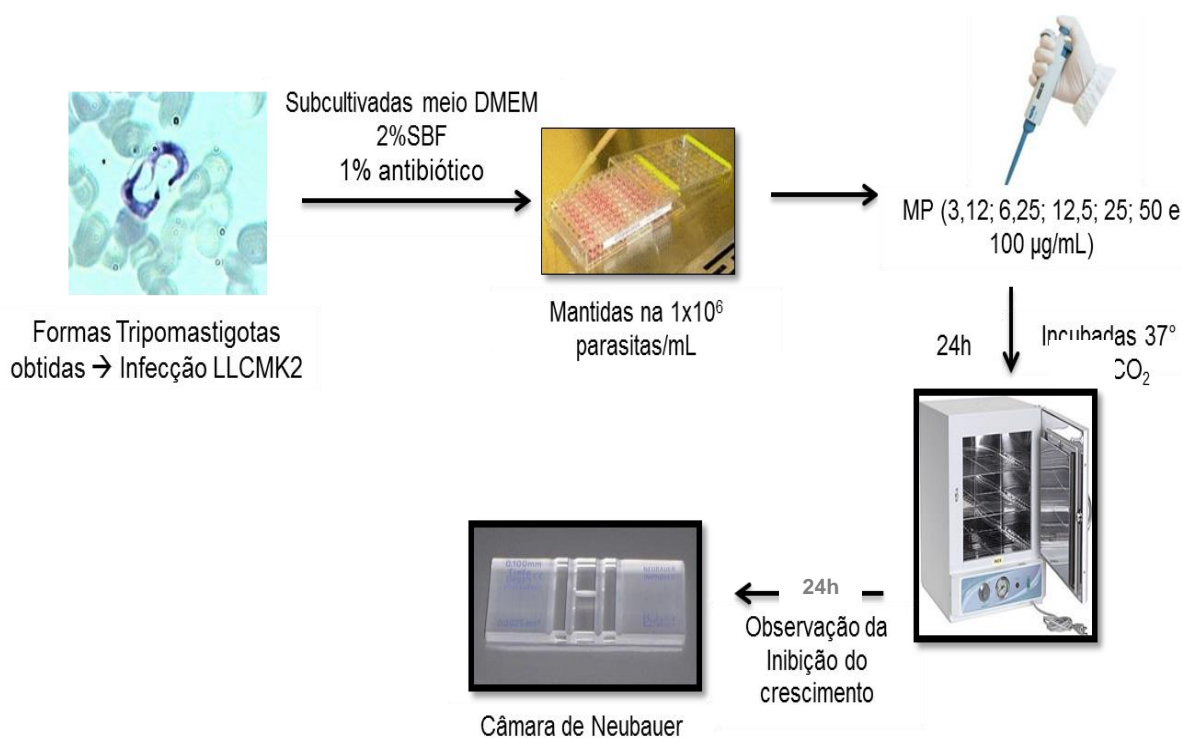
Fonte: Autora.

4.5. Avaliação do efeito do peptídeo mastoparano (MP) sobre formas tripomastigota de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de células LLCMK2 (Rhesus monkey kidney) infectadas, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), suplementado com 1% de antibiótico e 10% de soro bovino fetal (APARICIO *et al.*, 2004). As mesmas foram subcultivadas, em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^6 parasitas/mL e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em meio DMEM enriquecido com 1% de antibiótico e 2% de SBF. As alíquotas de diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) do MP foram adicionadas à suspensão de parasitas. A placa foi incubada por 24 horas nas condições de cultivo. Neste ensaio tivemos como controle negativo PBS estéril (pH 7.4). O movimento dos parasitas foi observado em microscópio invertido (x100) (ABE, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2002), sendo a inibição do

crescimento determinada por quantificação em câmara de Neubauer. As culturas sem tratamento foram consideradas 100% de crescimento e a CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada de acordo com o modelo PROBIT de análise de regressão. (Figura 06)

Figura 06 - Desenho esquemático dos ensaios de citotoxicidade em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



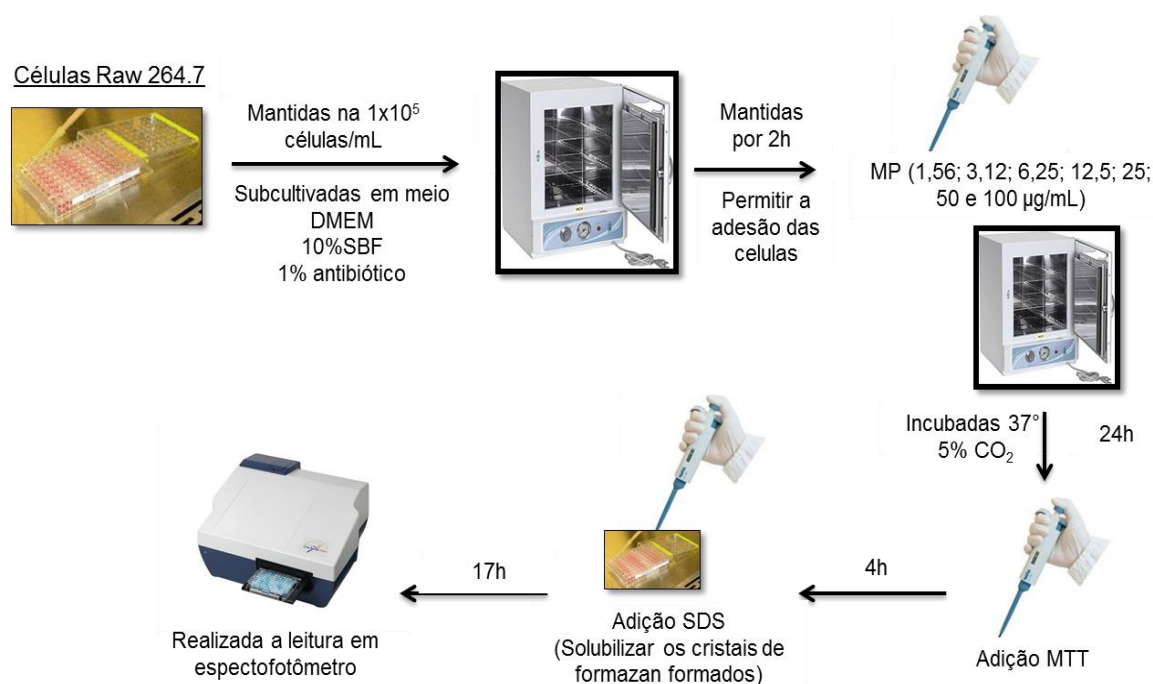
Fonte: Autora.

4.6 Avaliação da toxicidade do mastoparano em células de macrófagos

Com o intuito de saber a toxicidade do MP para as células de mamíferos foram realizados ensaios em linhagens de macrófagos Raw 264.7. As células foram subcultivadas em placas de microcultura ($\sim 1 \times 10^5$ céls/mL) em meio DMEM enriquecido com 10% de SBF e 1% de antibiótico, a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 2h para permitir a adesão das células. As células foram tratadas com

diferentes concentrações do peptídeo MP nas condições de cultivo. A viabilidade dos macrófagos foi determinada utilizando o ensaio com 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT; Sigma) dissolvido em PBS, que se baseia na atividade mitocondrial das células viáveis que são capazes de reduzir o MTT e formar um produto colorido insolúvel em água, o sal formazan (MOSMANN, 1983). Após o período de 24 horas de incubação com o MP, adicionou-se a solução de MTT (2,5mg/mL em PBS) em cada poço (10µL) por 4 horas nas mesmas condições e então adicionou-se 90 µL/poço de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram incubadas por 17h e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (570nm) (Figura 07). Culturas de macrófagos sem nenhum tratamento foram consideradas como 100% de viabilidade. A viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células sobreviventes e a concentração de mastoparano. O controle negativo correspondeu como 100% de sobrevivência.

Figura 07- Desenho esquemático do ensaio de toxicidade pelo MTT.



Fonte: Autora.

4.7 DOCKING MOLECULAR

Os ensaios *in silico* foram realizados no Laboratório de Engenharia de Materiais e da Computação de Sobral (LEMCS), sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos.

4.7.1 Estrutura Tridimensional do Mastoparano

Inicialmente, obtivemos a estrutura tridimensional do peptídeo MP a partir da sequência primária (IDWLKLGKMVMDVL) previamente estabelecida por Souza (2004) no programa Avogadro 1.1.1 (HANWELL, *et al.*, 2012). Posteriormente, foi realizada a otimização geométrica (minimização de energia) da estrutura através de cálculos químico-quânticos semi-empíricos, usando o programa MOPAC2012 (<http://openmopac.net>), adotando o método semi-empírico PM7.

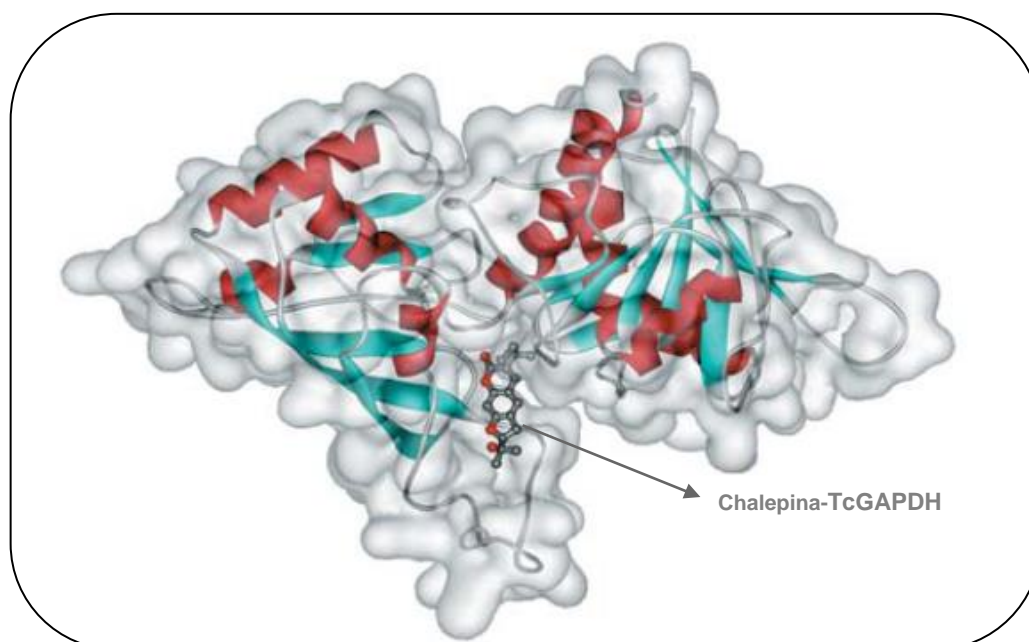
4.7.2 Estrutura cristalográfica do complexo *Tc*GAPDH-chalepina

Nesse estudo foi observado, por meio da estrutura tridimensional, a análise comparativa do mastoparano com a Chalepina, uma cumarina derivada de plantas da família Rutácea, pois essa substância além de apresentar potencial antiparasitário descrito na literatura, também já apresenta sua estrutura cristalográfica (Figura 08) determinada em banco de dados computacionais (SCIO *et al.*, 2003).

A estrutura cristalográfica do complexo *Tc*GAPDH-chalepina foi obtida a partir do RCSB Protein Data Bank (código PDB: 1K3T) elucidado por Pavão *et al.* (2002). O RCSB é um site de livre acesso que contém informações sobre formas 3D de diferentes estruturas.

A partir do conhecimento biológico e computacional prévio da Chalepina, a substância foi removida do complexo *Tc*GAPDH-chalepina, a fim de se obter também a estrutura cristalográfica da enzima *Tc*GAPDH isolada.

Figura 08- Estrutura Cristalográfica do complexo entre a enzima TcGAPDH e o inibidor cumarínico Chalepina.



Fonte: OLIVA, 2008 (modificado)

4.7.3 Sítios de ligação Mastoparano - TcGAPDH

Para identificar potenciais sítios de ligação para o MP na enzima TcGAPDH, o método computacional de docking molecular (que prevê a orientação preferencial de uma molécula a uma segunda) foi realizado com o programa ZDOCK 3.0.2 no servidor ZDOCK disponível no site <http://zdock.umassmed.edu/> (PIERCE, *et al.* 2014).

O ZDOCK é um programa de docking molecular baseado na Transformada Rápida de Fourier, uma técnica computacional, que procura todos os possíveis modos de ligação no espaço de translação e rotação entre proteína-polipeptídeo (PIERCE, 2011).

Cada posição foi avaliada por uma função escore baseada na energia, formada pelo potencial estatístico IFACE, forma de complementaridade e termos eletrostáticos (MINTSERIS, 2007).

O ligante utilizado foi o peptídeo Mastoparano (MP) otimizado e o alvo foi a enzima TcGAPDH (após a remoção da chalepina do complexo TcGAPDH-

chalepina). Após a otimização do ligante com o alvo, definiu-se uma região de interesse formada por resíduos do centro ativo da enzima (SEIDLER, 2013).

As previsões do programa ZDOCK foram filtradas utilizando os resíduos do sítio de ligação e um ponto de corte para distância de 6 Ångstron (Å). A melhor posição de acoplamento molecular do peptídeo na *Tc*GAPDH foi selecionada com base na posição peptídeo-enzima de maior score, e usada para a construção do complexo *Tc*GAPDH-MP.

Posteriormente, o complexo *Tc*GAPDH-chalepina foi utilizado para comparar a posição do ligante no sítio de ligação. Gráficos e manipulações com as estruturas moleculares foram realizadas com pacote UCSF Chimera 1.8 (Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics da Universidade da Califórnia, San Francisco) (PETTERSEN, *et al.*, 2004).

4.8 Análise estatística

As médias obtidas em cada experimento da atividade tripanocida e toxicidade celular foram comparadas utilizando ANOVA e o pós-teste de Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para a análise.

As análises de regressão linear também foram realizadas no programa Graph Prisma 5.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

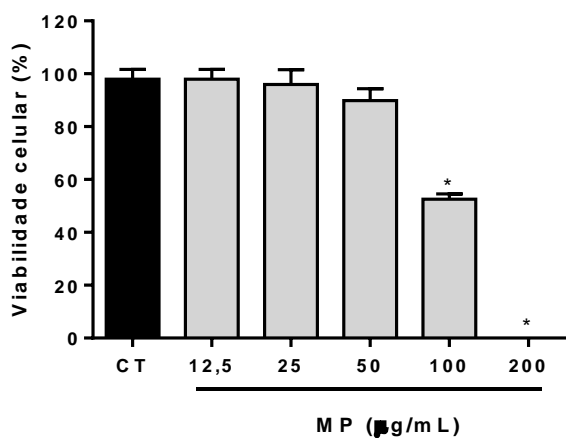
5.1 Efeito citotóxico sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O ensaio para avaliar a ação do MP isolado do veneno da Vespa *Polybia Paulista* sobre formas epimastigota de *T.cruzi* foi realizado após 24, 48 e 72 horas de incubação. Nossos resultados mostraram que o MP apresenta efeito citotóxico estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ em todos os tempos de incubação. Após 48h a citotoxicidade foi significativa, também, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

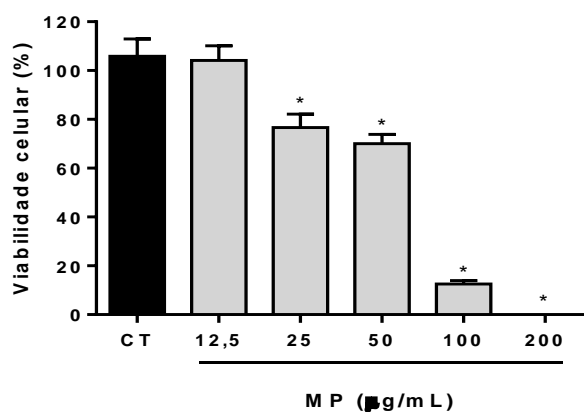
A concentração inibitória para 50% das células (CI_{50}) encontradas em 24, 48 e 72h de incubação foi de 102 $\mu\text{g/mL}$, 53,95 $\mu\text{g/mL}$ e 58,51 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A figura 09A, 09B e 09C representam a perentagem de viabilidade celular sobre as formas epimastigota após os períodos de 24, 48 e 72h, respectivamente, em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%, onde observamos um efeito inibitório no crescimento das formas epimastigotas.

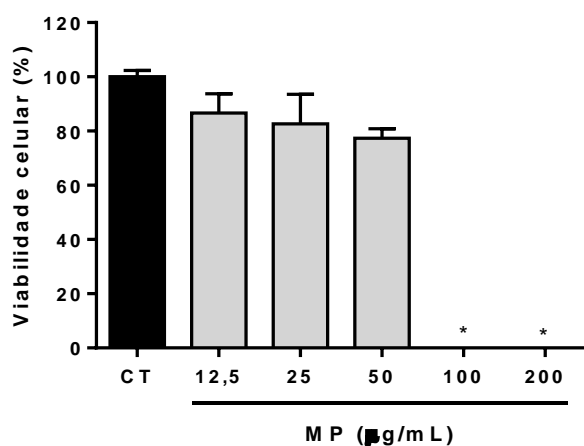
Figura 09 - Efeito citotóxico do mastoparano (MP) em forma epimastigota de cepa Y de *T. Cruzi* após 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação.



(A)



(B)



(C)

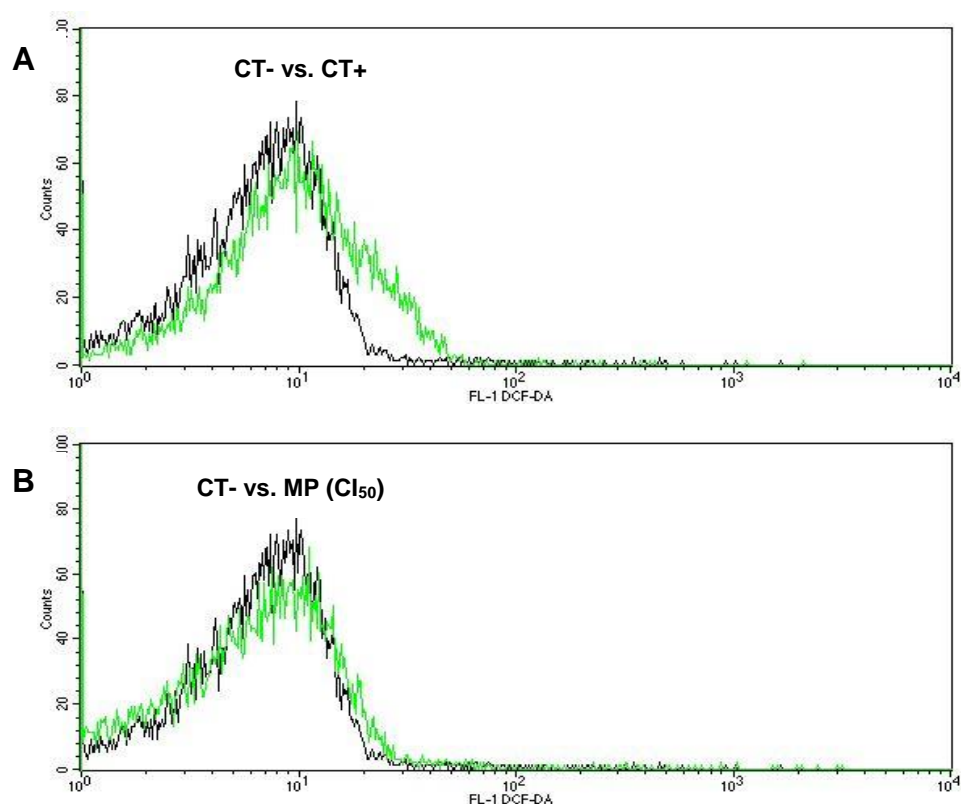
Fonte: Autora

Legenda: Os dados são expressos por média \pm EPM da quantificação e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), *p < 0.05.

5.2 Análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas em formas epimastigotas

A produção de espécies reativas foi analisada após 6h de incubação do peptídeo MP em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi observado que o mastoparano aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo encontrado um deslocamento à esquerda da população tratada com o MP em relação ao grupo controle, como demonstrado na figura 10. Além disso, como ilustrado na figura 11, houve um aumento significativo na intensidade relativa de fluorescência, quando comparado ao grupo controle negativo (PBS). O grupo controle positivo, tratado com terc-butilhidroperóxido (25 μ M), demonstrou efeito semelhante.

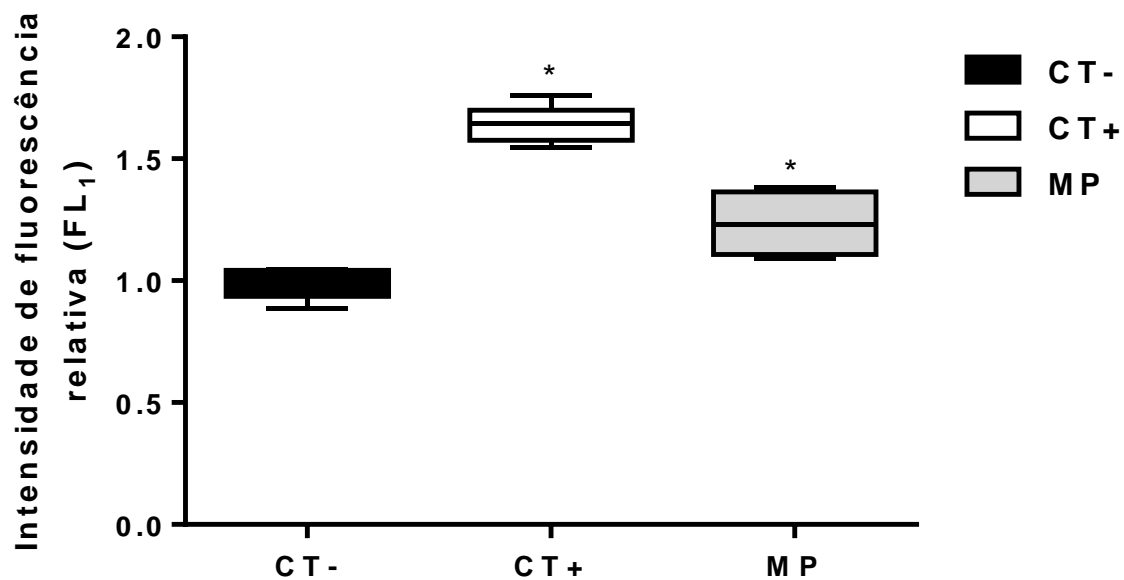
Figura 10 - Histograma da produção de Especie Reativa de Oxigênio.



Fonte: Autora

Legenda: Histograma da intensidade de fluorescência (FL₁) após adição do DCF-DA do controle positivo (A) e do Mastoparano (B). O eixo X representa a intensidade DCF-DA, enquanto o eixo Y indica as contagens de células em intensidade de fluorescência correspondente. A linha preta é a interpretação de fluorescência do controle negativo (CT-; PBS). A linha verde corresponde a atividade de produção de ERO pelo controle positivo (CP+, terc-butilhidroperóxido) no histograma superior e pelo Mastoparano (MP) no histograma inferior.

Figura 11 - Análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas em epimastigotas por citometria de fluxo.



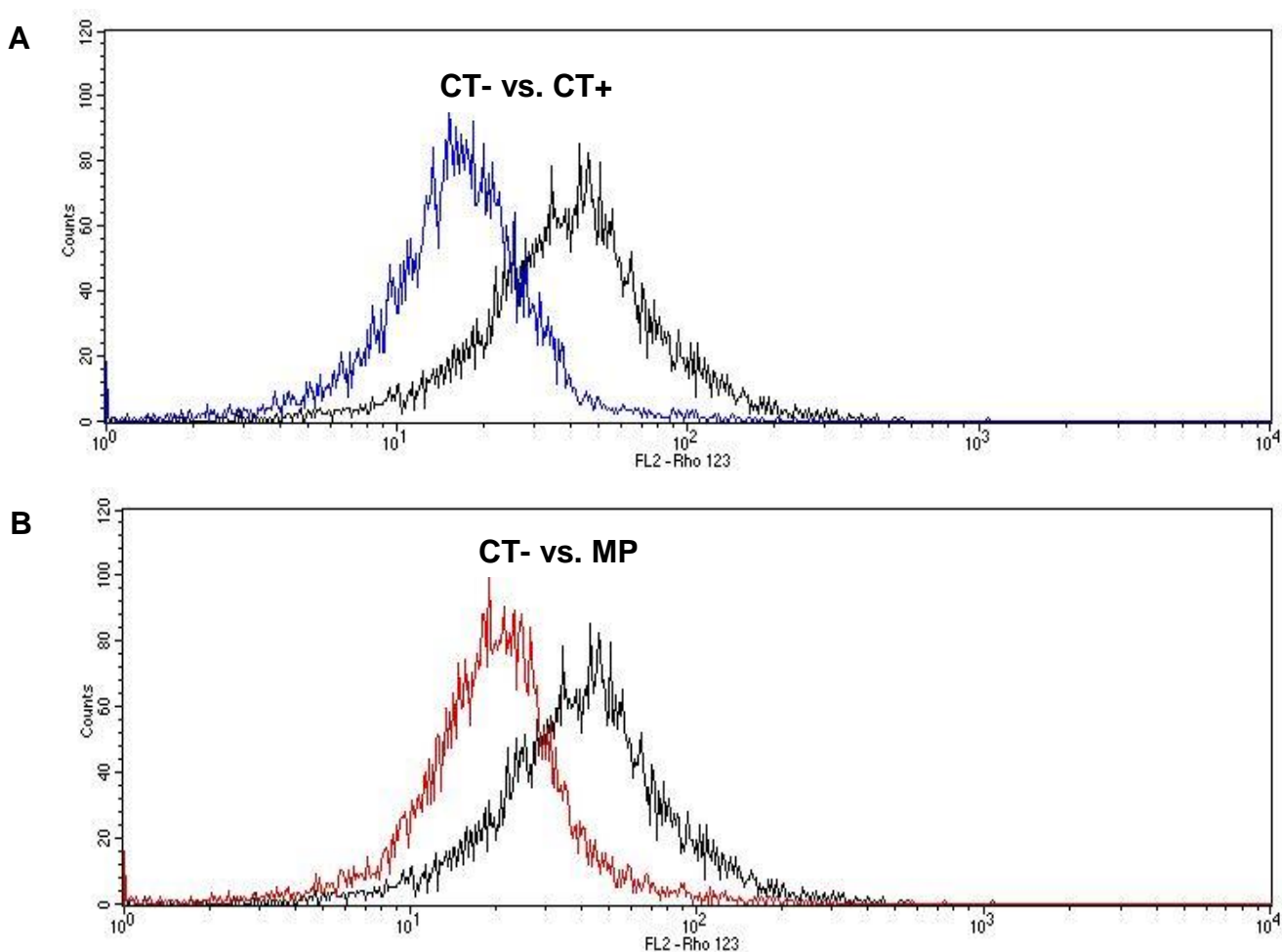
Fonte: Autora

Legenda: Intensidade de fluorescência dos grupos controle negativo (CT-, PBS); controle positivo (CT+, terc-butilhidroperóxido) e MP (Mastoparano). A Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), * $p < 0.05$ quando comparados com o grupo controle negativo.

5.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Com o objetivo de identificar alterações na membrana mitocondrial induzidas por MP, as células tratadas por 24 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por rodamina (Rh-123). No ensaio realizado com MP, os resultados mostraram uma diminuição do potencial de membrana dos parasitas, observado pela redução da fluorescência, conforme demonstrado nas figuras 12 e 13.

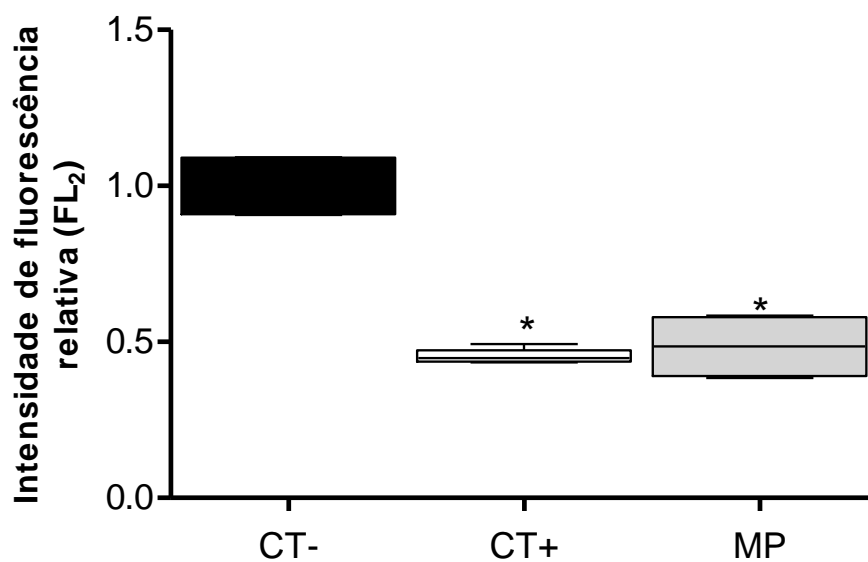
Figura 12 - Histograma do potencial de membrana mitocondrial.



Fonte: Autora

Legenda: Histograma da intensidade de fluorescência (FL₂) após marcação com Rh-123 do controle positivo (A) e do Mastoparano (B). O eixo X representa a intensidade fluorescência de Rh-123, enquanto o eixo Y indica as contagens de células em intensidade de fluorescência correspondente. A linha preta é a interpretação de fluorescência do controle negativo (PBS). A linha azul corresponde o potencial de membrana do controle positivo (terc-butilhidroperóxido) no histograma superior (A) e a linha vermelha corresponde o potencial de membrana do Mastoparano no histograma inferior (B).

Figura 13 - Análise do potencial de membrana em epimastigotas por citometria de fluxo.



Fonte: Autora

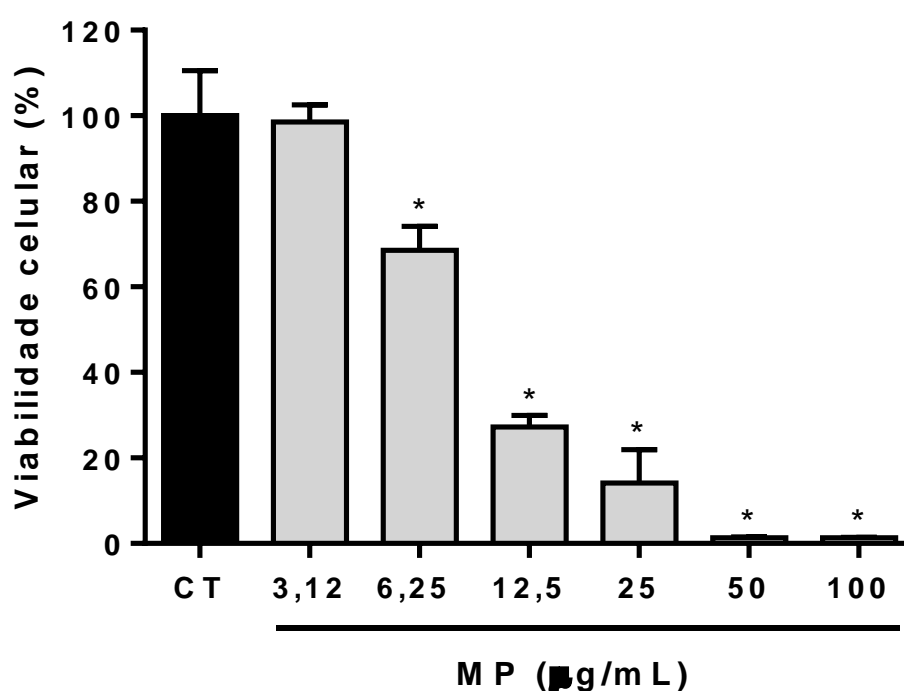
Legenda: Intensidade de fluorescência dos grupos CT- (PBS); CT+ (terc-butilhidroperóxido) e MP (Mastoparano). A Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), * $p < 0.05$ quando comparados com o grupo controle negativo.

5.4 Efeito citotóxico sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A citotoxicidade do peptídeo MP isolado do veneno da vespa *Polybia Paulista* foi avaliada em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do peptídeo (em $\mu\text{g/mL}$: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100). Os resultados mostraram que o MP reduziu a viabilidade das formas tripomastigotas com concentração inibitória para 50% das células (CI_{50}) equivalente a $8,83\mu\text{g/mL}$.

A figura 14 representa a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%, onde observamos um efeito inibitório no crescimento das formas epimastigotas concentração dependente.

Figura 14 - Efeito citotóxico do mastoparano (MP) em forma tripomastigota de *T. Cruzii* após 24h de incubação.



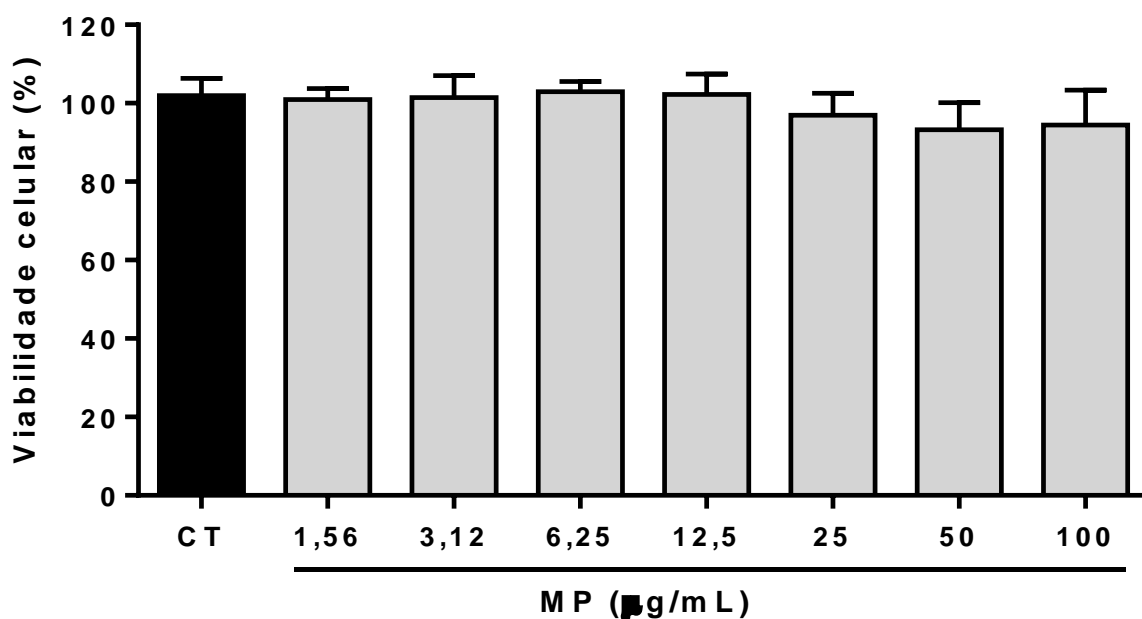
Fonte: Autora

Legenda: Os dados são expressos por média \pm EPM da quantificação e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), $*p < 0,05$.

5.5 Ensaio de Toxicidade

A toxicidade do peptídeo MP foi avaliada em macrófagos murinos RAW 264.7 após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo. Foi possível observar que o peptídeo não induziu morte celular significativa nas diferentes concentrações estudadas. A figura 15 representa o efeito do peptídeo sobre a viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

Figura 15- Efeito do peptídeo MP sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7, ensaio com MTT.



Fonte: Autora

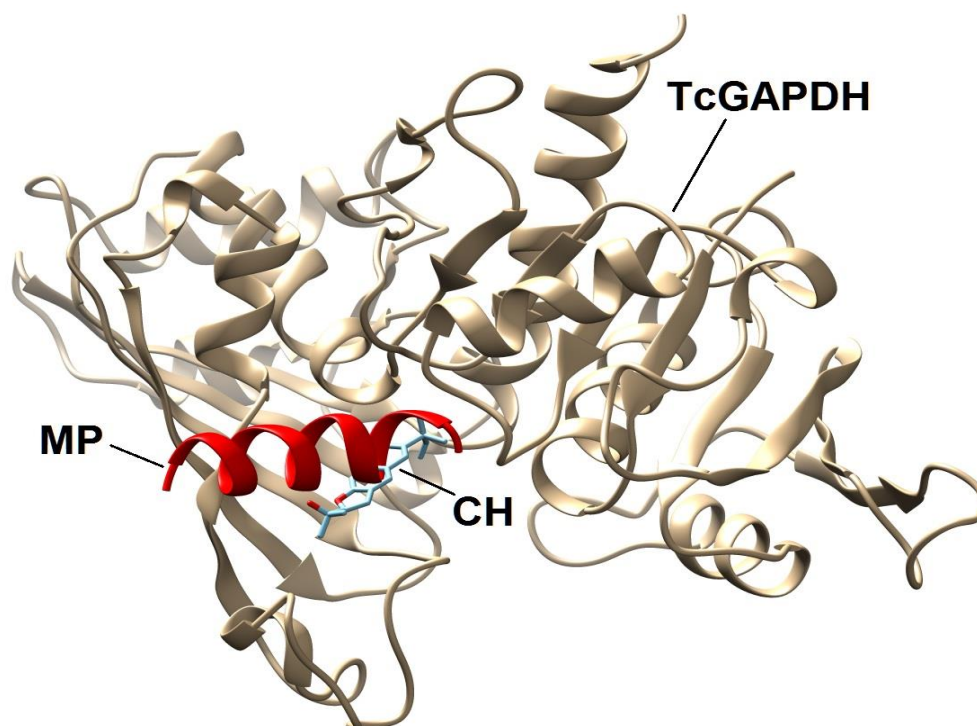
Legenda: Os dados são expressos por média \pm EPM da absorbância e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett).

5.6 Docking Molecular

Tomando como base os resultados parciais da atividade antiparasitária do peptídeo mastoparano (MP), foi realizada a análise de docking molecular com o objetivo de sugerir um possível mecanismo de ação do peptídeo sobre o parasito através da interação do MP com a enzima *TcGAPDH*. Dessa forma, por meio da utilização de um programa computacional, ZDOCK, conseguimos observar a posição de melhor acoplamento do peptídeo MP na *TcGAPDH*.

Na figura 16, observa-se o acoplamento molecular do MP na enzima *TcGAPDH*. Também pode ser observada, para comparação, a posição da molécula de chalepina (obtida a partir de dados cristalográficos do complexo *TcGAPDH*-chalepina).

Figura 16. Acoplamento molecular do peptídeo MP na enzima *TcGAPDH* e a posição da chalepina (CH) obtida a partir de dados cristalográficos do complexo *TcGAPDH*-chalepina como parâmetro comparativo



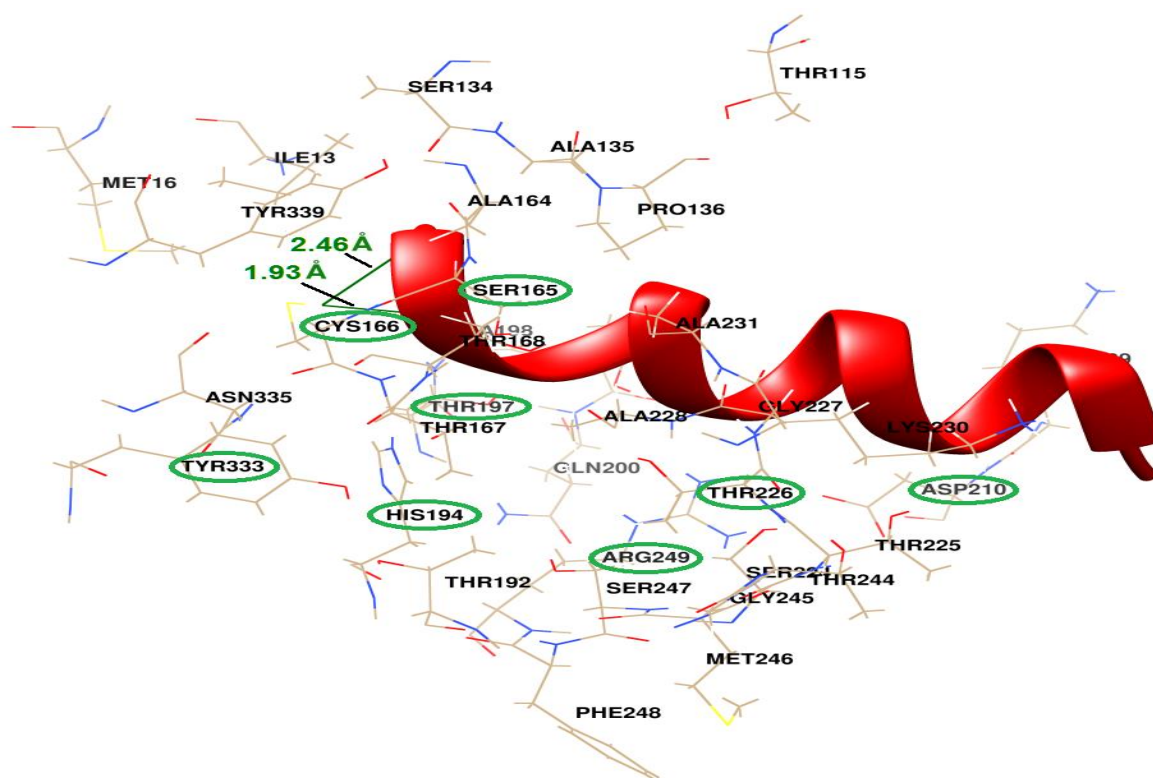
Fonte: Autora

Legenda: Estrutura do peptídeo mastoparano (MP- Vermelho) na enzima *TcGAPDH*. Estrutura da Chalepina (Azul claro) na enzima *TcGAPDH*.

Com isso, podemos observar que a posição do MP é semelhante à ocupada pela chalepina no sítio ativo da *TcGAPDH*, sugerindo assim a possibilidade de um efeito inibitório do MP sobre a *TcGAPDH*.

Na busca de obter um melhor detalhamento na ligação MP- *TcGAPDH*, também obtivemos pelo mesmo programa as regiões de interação entre as moléculas. Dessa forma, a Figura 17 nos mostra detalhes da região de interação do MP com resíduos de aminoácidos da *TcGAPDH*. Foram considerados resíduos do sítio enzimático com distâncias $< 3,5\text{\AA}$ a partir de átomos do ligante. Essa região consiste nos seguintes resíduos: Ala135,164,198,228,231; Arg249; Asp210; Cys166; Gln200; Gly227,245; His194; Ile13; Leu130; Lys209,230; Met246; Pro136; Ser134,165,224,247; Thr115,167,168,197,199,225,226,244; e Tyr333,339.

Figura 17. Regiões de interação do MP com resíduos de aminoácidos da *TcGAPDH*.

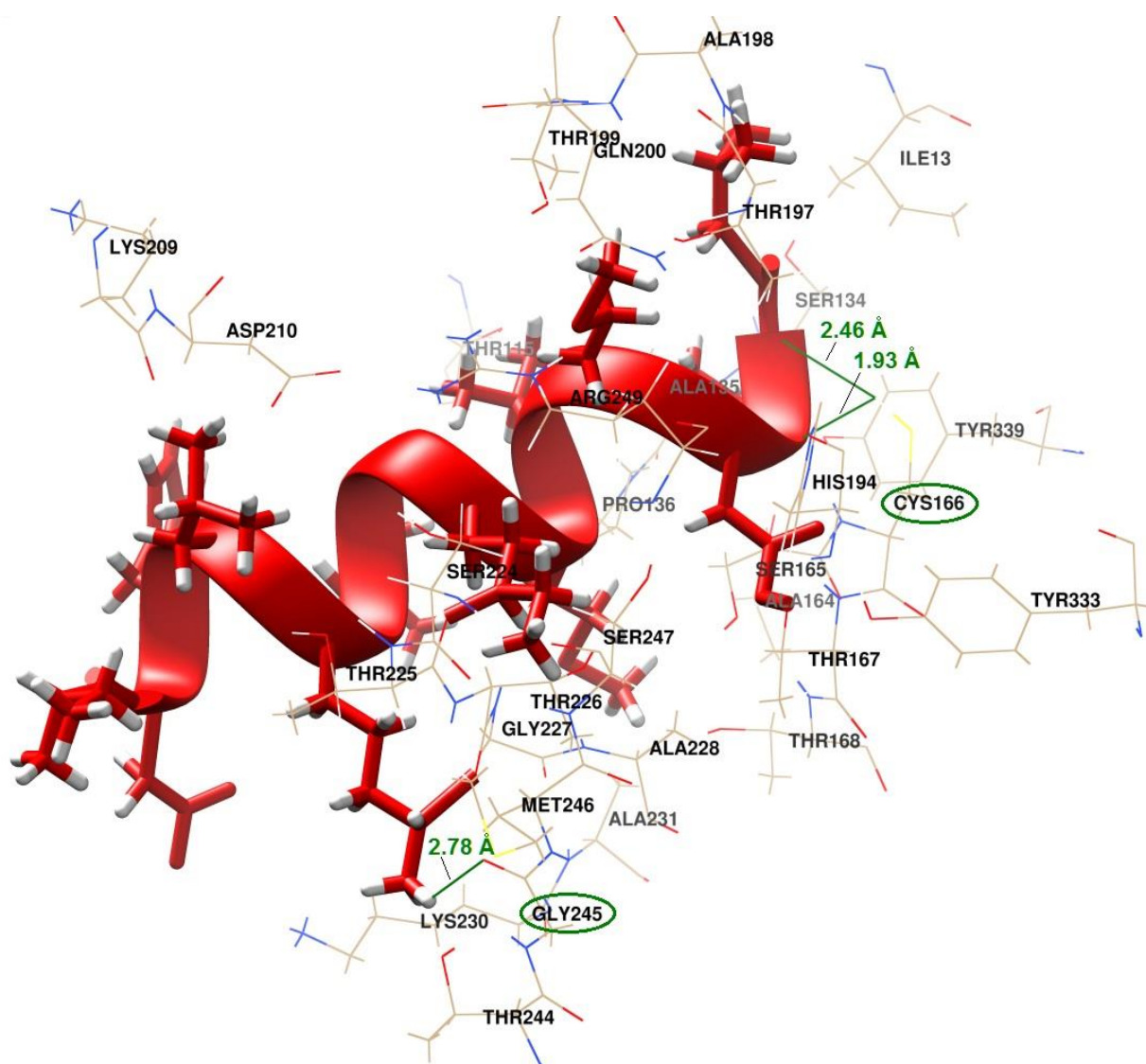


Fonte: Autora

Legenda: Resíduos de aminoácidos, com distância $< 3,5\text{\AA}$ do peptídeo MP no sítio de ligação da enzima *TcGAPDH* (Elipses verde)

Após encontrada pelo programa ZDOC as melhores posições de interação Observou-se, pelo programa Chimera, que o peptídeo MP e a *Tc*GAPDH podem formar três ligações de hidrogênio: duas envolvendo a Cys166 do *Tc*GAPDH com a Val13 e Asp12 do MP e outra envolvendo a Gly245 do *Tc*GAPDH com a Lys5 do MP (Figura 18).

Figura 18. Ligações inter-moleculares de hidrogênio (linhas verdes) entre o peptídeo e os resíduos Cys166 e Gly245 (elipses verdes) da enzima *Tc*GAPDH.



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o Mastoparano apresentou efeito citotóxico para as formas epimastigotas (forma proliferativa residente no vetor) e tripomastigotas (infectante) do *T. cruzi*. Essa atividade antiparasitária corrobora com outros trabalhos realizados com venenos de Himenópteros descritos na literatura. Estudos prévios mostraram que o veneno da abelha *Apis mellífera* reduziu a viabilidade da cepa Y de *T. cruzi*, concentração dependente, e atribuiu a atividade antiparasitária ao peptídeo melitina presente na toxina de abelhas. (ADADE *et al.*, 2012; ADADE *et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrado que o veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* inibiu o crescimento das formas epimastigota e tripomastigorta de *Trypanosoma cruzi* (LIMA, 2014).

No presente estudo, o efeito inibitório nos parasitas observado para as formas epimastigotas nos períodos de incubação (24, 48 e 72h) foi estatisticamente significativo. Porém, foi evidenciado uma redução do potencial inibitório do mastoparano após 72h de incubação, sendo observada significância estatística somente nas concentrações de 100 e 200 µg/ml. Esse resultado sugere que o efeito inibidor pode, por meio de mecanismo desconhecido, promover uma recuperação gradual ao longo do tempo de algumas das células que, imediatamente após o tratamento com MP, estavam severamente estressadas, mas não realmente mortas. Esta hipótese pode ser explicada se presumirmos que a presença de um possível inibidor da atividade do peptídeo possa ter “revitalizado” o restante de células vivas do parasita. Esta possibilidade pode sugerir a ausência de um efeito tripanocida concentração dependente após um período prolongado de incubação (YORDANOVA, *et.al.*, 2013).

A suscetibilidade de muitos parasitas ao estresse oxidativo é um fenômeno que vem sendo investigado e discutido pela comunidade científica. É fato que a geração de ERO associada à inibição de enzimas antioxidantes endógenas poderia ser o enfoque principal em abordagens para o desenho racional de drogas antiparasitárias (AVELAR, 2013). Partindo desse conhecimento prévio e na tentativa de melhor compreender o efeito tripanocida do peptídeo Mastoparano isolado da vespa *Polybia paulista*, foi investigada a participação de ERO no provável

mecanismo de citotoxicidade do peptídeo sobre os parasitas de *T. cruzi* através da análise em citometria de fluxo.

No presente estudo, usou-se o DCF, marcador de estresse oxidativo, e viu-se que o mastoparano aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que um dos efeitos citotóxicos do peptídeo sobre cepas Y de *T. cruzi* pode estar relacionado ao metabolismo oxidativo do parasita.

Durante o metabolismo oxidativo, uma parte do oxigênio que é consumido pela mitocôndria é parcialmente reduzido, levando à formação de ERO (DEOLINDO, *et. al.* 2010). Classicamente essa organela é considerada a responsável pela produção de energia necessária para a ocorrência de processos bioquímicos na célula, porém, quando a quantidade de espécies reativas excede a capacidade antioxidante da mitocôndria, o estresse oxidativo leva ao dano mitocondrial. Este efeito pode ser ocasionado devido a um aumento da síntese de lípidos da membrana em resposta ao estresse (TOOZE, 2013). Nesse sentido, podemos sugerir que após o período de tratamento do MP, o parasita deve “se adaptar” com às ERO tanto de origem externa como interna, sendo a mitocôndria o principal sítio gerador de ERO na célula.

Estudos indicam ainda que espécies reativas de oxigênio aumentem o estresse oxidativo ativando, por choque térmico, as proteínas e iniciando uma desorganização da membrana e do citoplasma da célula afetada (GUO *et al.*, 2012). Tem-se demonstrado que as condições que resultam na perda da homeostase celular, incluindo o estresse oxidativo e perturbações mitocondriais, podem desencadear mecanismos de controle destinados a restabelecer a função e viabilidade celular. Entre esses mecanismos, a autofagia promove a degradação coordenada de organelas e moléculas danificadas numa tentativa para restaurar a homeostase (BAIXAULI *et al.*, 2014), sendo a membrana plasmática conhecida como uma das principais fontes de membrana autofagossomal (TOOZE, 2013).

Diante do conhecimento de que as espécies reativas de oxigênio podem causar danos a vários componentes celulares, incluindo alteração em membrana, levando a possível morte do parasita, é importante destacar que, para escapar deste dano celular ocasionado pela presença de ERO, todos os organismos apresentam

mecanismos antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante do *T. cruzi* capacita o parasita a lidar com o estresse oxidativo nos diferentes ambientes em que vive (PIÑEYRO *et al.*, 2008). Essa capacidade do parasita sobre a produção de ERO pode ter influenciado o efeito evidenciado do peptídeo sobre a forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi* após 72h de incubação.

O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial pode ser consequência de vários fatores, sendo considerado um indicador de dano mitocondrial e definido como um estágio inicial de morte celular. A citometria de fluxo pode ser usada para estimar o potencial transmembrânico na presença de corantes como a Rodamina 123 (SMAILI *et al.*, 2003). Nesse sentido, para dar continuidade ao provável mecanismo de ação do MP sobre o parasita e diante dos resultados encontrados, direcionamos o estudo para verificar o envolvimento do peptídeo da permeabilidade de membrana mitocondrial.

Como resultado, foi observado uma significativa alteração mitocondrial do parasita, observada no histograma pelo deslocamento da intensidade da fluorescência para a direita. Esse efeito é outro importante indício de alteração celular do peptídeo sobre o parasita. O fato do MP apresentar conformação α -hélice anfipática pode sugerir o resultado do potencial transmembrânico encontrado. No estudo de Souza, *et. al.*, (2005), a característica da estrutural peptídica influenciou a presença da atividade biológica. Assim, foi observado que o peptídeo *Polybia*-MPI, que apresenta estrutura α -hélice, apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto o peptídeo, *Polybia*-CP apresentou ação antimicrobiana apenas contra o bactérias Gram-positivas. Leite, *et.al.*, (2011) relatou que a anfipaticidade de Mastoparanos isolanos do veneno da vespa *Polybia paulista*, contribuem para modular as atividades biológicas apresentadas desses peptídeos.

Outro fator que possa sugerir a atividade em membrana encontrada pelo mastoparano isolado do veneno da vespa *Polybia paulista* pode ter relação pela influência do peptídeo em estudo apresentar determinada seletividade pela membrana plasmática do parasita. No estudo realizado por Ruben, *et. al* (1996), em formas de circulação sanguínea intactas de *Trypanosoma brucei*, foi evidenciado uma atividade seletiva em membrana plasmática pelo influxo de cálcio em *T. brucei*,

aonde a ativação da via de tripanossoma era dependente de um potencial de membrana intacta e da concentração intracelular de cálcio livre.

Com o intuito de avaliar a toxicidade do MP sobre células de mamíferos, estudou-se, também, a ação do peptídeo sobre macrófagos murinos. O presente estudo observou que não houve toxicidade nas diferentes concentrações estudadas. Assim, os resultados encontrados nos direcionaram para dar continuidade ao provável mecanismo de ação do peptídeo no *T.cruzi*.

O conhecimento fundamentado sobre as vias metabólicas usadas pelo *Trypanosoma cruzi* apresenta grande interesse para pesquisas científicas (MELOS e ECHEVARRIA, 2012). Dando continuidade aos estudos de avaliação do efeito do MP sobre o parasita, sabendo que nos tripanossomatídeos a principal via bioquímica de obtenção de energia do *T. cruzi* é a via glicolítica e que a enzima GAPDH glicossomal do *T.cruzi* é uma das principais enzimas da via glicolítica do parasita, procuramos identificar os potenciais sítios de ligações entre o peptídeo e a enzima TcGAPDH.

Assim, foram realizados ensaios in silico através do estudo de docking molecular na perspectiva de conhecer a possível ligação do MP com a enzima GAPDH do parasita (TcGAPDH). A partir do conhecimento da sequência primária do MP, foi possível obter a sua estrutura tridimensional e assim foi possível observar as posições de melhor acoplamento MP- TcGAPDH.

O presente estudo identificou diferentes regiões de interação do MP com resíduos de aminoácidos da TcGAPDH, o que direciona o possível mecanismo da atividade inibitória do peptídeo ao *T.cruzi*. Diante do conhecimento prévio do potencial inibitório de substâncias naturais sobre o parasita, realizamos a análise comparativa entre o MP e a Chalepina, uma cumarina derivada de plantas da família Rutaceas, que já apresenta sua estrutura cristalográfica elucidada (PAVÃO, *et. al.*, 2002). Assim, observamos que a interação enzima – peptídeo observada entre o complexo MP-TcGAPDH é semelhante à ligação da Chalepina no sítio ativo da enzima direcionando, assim, para a possibilidade de um efeito inibitório semelhante sobre a TcGAPDH.

Previamente ao estudo de docking realizado com cumarinas da família Rutaceas, Vieira, *et. al.* (2001) demonstrou a atividade de extratos de plantas pertencentes às famílias Rutaceae e Meliaceae na enzima GAPDH de *T. cruzi*. Neste mesmo trabalho, são relatadas atividades de diferentes cumarinas sobre a enzima GAPDH, sendo a chalepina a substância que apresentou maior atividade antiparasitária.

Na busca de melhor identificarmos o potencial de interação do MP na enzima TcGAPDH, realizou-se a investigação mais específica dos sítios de ligação entre as substâncias, através de buscas por resíduos do sítio enzimático com distâncias < 3,5Å, a partir de átomos do ligante. Assim, observou-se que o peptídeo MP e a TcGAPDH podem formar três ligações de Hidrogênio: duas envolvendo Cis166 de TcGAPDH com Val13 e Asp12 do MP e outra envolvendo Gly245 de TcGAPDH com Lys5 do MP. As ligações de H são importantes em interações entre o ligante e a enzima, especialmente com os resíduos catalíticos da TcGAPDH, tal como o Cys166.

De acordo com Seidler (2013), os resíduos Arg249, Asp210, Cis166, His194, Ser165, Thr197, Thr226 e Tyr333 desempenham um papel significativo no centro ativo da enzima do *T. cruzi*, participando do mecanismo catalítico da atividade de oxidoreductase da TcGAPDH. Em nossos resultados, evidenciamos também interações dos resíduos de aminoácidos descritos acima.

Souza, *et. al.* (1998) sugere que o resíduo Asp210 pode estar envolvido em processos de inibição seletivos. Por exemplo, a chalepina inibe a TcGAPDH, mas não inibe a GAPDH humana. A substituição do Asp210 (*T. cruzi*) por Leu194 (humano) pode produzir interações polares menos eficazes, diminuindo a especificidade da chalepina para a GAPDH humana (PAVÃO, *et al.*, 2002). Assim, a posição do peptídeo com maior pontuação obtida a partir do acoplamento molecular com a TcGAPDH sugere a possibilidade de inibição dessa enzima. Esse pode ser um mecanismo para a ação biológica do peptídeo sobre o parasita. O caminho até chegar a um novo fármaco ainda será longo, mas observamos que é possível inibir a atividade do parasita ao interagir o MP com a enzima TcGAPDH.

As análises realizadas neste trabalho poderão contribuir para ampliar o conhecimento sobre a ação biológica do peptídeo presente no veneno da vespa *Polybia paulista*. Assim, o presente estudo abre perspectivas para futuros trabalhos na busca por modelos moleculares para o tratamento de doenças parasitárias.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Conclui-se que o mastoparano isolado do veneno da vespa *Polybia paulista* apresentou potencial citotóxico sobre as formas epimastigota e tripomastigota de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, envolvendo a participação do estresse oxidativo e alteração do potencial de membrana mitocondrial.
- Além disso, o MP parece inibir a TcGAPDH por meio da interação de aminoácidos que participam do mecanismo catalítico de oxiredutase da enzima de *T. cruzi*.
- Por fim, esse peptídeo não apresentou atividade citotóxica em células de macrófagos.
- Portanto, o mastoparano se destaca como importante substância bioativa contra cepa Y de *T.cruzi*.

CONSIDERAÇÕES

FINAIS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sempre haverá a necessidade da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico, seja pela falta de eficiência dos fármacos atuais, seja pelo alto nível de toxicidade ou pelo surgimento de novas doenças e de cepas resistentes aos atuais fármacos utilizados. Aliás, talvez, não seja só a descoberta de novas moléculas promissoras, mas sim a descobertas de propriedades e interações de moléculas já existentes.

Dessa forma, o presente estudo alcançou os objetivos inicialmente almejados, estudando o efeito tripanocida do peptídeo mastoparano (MP) presente no veneno da vespa *Polybia paulista*.

Esse estudo ampliou a compreensão da ação de substâncias bioativas presente no veneno da vespa *Polybia paulista* e abriu perspectivas para futuros estudos na busca de modelos moleculares para desenvolvimento de fármacos contra a Doença de Chagas.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; YAMAUCHI, T.; NAGAO, T.; KINJO, J.; OKABE, H.; HIGO, H.; AKAHANE, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in Rosemary. **Biol Pharm Bull.** v.25, n.11, p.1485-1487, 2002.

ADADE, C. M.; CHAGAS, G. S.; SOUTO-PADRÓN, T. Apis mellifera venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology.** v.11, p.1444-61, 2012.

ADADE, C. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology.** v.138, n.1, p.46-58, 2011.

ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R.; PAIS, J. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon.** v.69, p.227-39, 2013.

AFONSO, A.M.; EBELL, M.H.; TARLETON, R.L. A systematic review of high quality diagnostic test for Chagas Disease. **PLOS- Neglected Tropical Disease.** v.6, p.1-9, 2012.

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

ANDRADE, M.C. Avaliação da resposta eletrocardiográfica e sorológica ao tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase crônica da doença de Chagas. **Dissertação (Mestrado).** Departamento de Patologia e Medicina Legal. Universidade Federal do Ceará. p.91, 2013.

APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity.** v.72, n.10, p.5892-5902, 2004.

ARAÚJO, A.; JANSEN, A.M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L.F. Paleoparasitology of Chagas disease – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.104, p. 9-16, 2009.

ARAUJO-JORGE, T. Doença de Chagas. Disponível em: <<https://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 11 de Março de 2014.

AVELAR, L.G.A. O papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Trematoda) e na proteção contra o estresse oxidativo. **Tese (Doutorado).** Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. P.116. 2013.

BAIXAULI, F.; LOPEZ-OTIN, C.; MITTELBRUNN, M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. **Front Immunol.** v.5. 2014.

BAKKER, B.M.; MICHELS, P.A.M.; OPPERDOES, F.R.; WESTERHOFF, H.V. What Controls Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*? **Journal of Biological Chemistry.** v. 274, n.21, p. 14551 – 14559, 1999.

BAKKER, B.M.; WESTERHOFF, H.V.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.M. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.106, p.1-10, 2000.

BEARD, C.B.; PYE, G.; STEURER, F.J.; RODRIGUEZ, R.; CAMPMAN, R.; PETERSON, A. T.; RAMSEY, J.; WIRTZ.; ROBINSON, L.E. Chagas disease in a domestic transmission cycle in southern Texas- USA. **Emerging Infectious Disease.** v. 9, n.1, 2003.

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

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCORONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.92, p.7162–7166, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista Saúde Pública.** v.44, n.1, p.200-202, 2010.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Rev. Microbiol.** v.27, p.347-382, 1973.

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

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Rev Inst Med Trop.** v.44, p.29-37, 2002.

CASSÉ, R.T. AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE UM PEPTÍDEO ISOLADO DA PEÇONHA DA VESPA *Polybia dimorpha*. **Monografia.** Brasília – DF.p 45. 2014.

CASTILHO, M. S. Planejamento racional de drogas contra tripssomatídeos: gGAPDH de *trypanosoma cruzi* e XPRT de *Leishmania major*. **Tese (Doutorado)** Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo. p.187. 2004.

CAVALCANTI, L.P.G; ROLIM, D.B.; NETO, R.J.P.; VILAR, D.C.L.F.; NOGUEIRA, J.O.L.; POMPEU, M.M.L. Microepidemia de doença de chagas aguda por transmissão oral no ceará. **Cad Saúde Coletiva**. v. 17, p. 911-921, 2009.

CEROVSKY, V.; SLANINOVÁ, J.; FUCÍK, V.; HULACOVÁ, H.; JEZEK, R.; BOROVIČKOVÁ, L. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. **Peptides**. v. 29, n. 6, p. 992–1003, 2008.

CESTARI, I. S. **Trypanosoma cruzi e o Sistema Complemento**: mecanismos de ativação e o papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispaning) na resistência à lise de cepas de classe I e II. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.1, p.159-218, 1909.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A.. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Ver**. v.59, n.3, p.527-605, 1979.

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

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature-Outlook. (Sppl)**. p.54-55, 2010.

CORTEZ, J.; RAMOS, E.; VALENTE, C.; SEIXAS, J.; VIEIRA, A. A expressão global da doença das chagas. **Acta Med Port**. v.25, p.332-339, 2012.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.102, p.113-122, 2007.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. i. avaliação preliminar. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.30, p.139-144, 1997.

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

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.106, p.641-645. 2011.

ČUJOVÁ, S.; BEDNÁROVÁ, L.; SLANINOVÁ, J.; STRAKA, J.; ČEŘOVSKÝ, V. Interaction of a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of solitary bee *Colletes daviesanus* with phospholipid vesicles and *Escherichia coli* cells. **J Peptide Science**. v.20, p. 885-95, 2014.

DANILENKO, M.; WORLAND, P.; CARLSON, B.; SAUSVILLE, E. A.; SHARONI, Y. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein directed and membrane perturbing activities. **Biochem Biophys Res Commun.** v.196, n.3, p.1296-302, 1993.

DE LIMA, D. C.; ABREU, P. A.; DE FREITAS, C. C.; SANTOS, D. O.; BORGES, R. O.; DOS SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Snake venom: Any clue for antibiotics and CAM? **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

DECIT, Departamento de Ciência e Tecnologia. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública.** v.44, p.200-2,2010.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. L. amino acid oxidase activity present in fractions of Bothrops jararaca venom is responsible for the induction of programmed cell death in Trypanosoma cruzi. **Toxicon.** v.56, n.6, p.944-55, 2010.

DIAS, J.C. Globalization, inequity and Chagas disease. **Cad. Saude Publica.** v.23, n.1, p.13–22, 2007.

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

DIAS, J.C.P.; NETO, V.A.; LUNA, E.J.A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

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

DIAS, J.C.P. Doença de chagas, ambiente, participação e estado. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** v.17, p.165-169, 2001.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA,G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím. Nova.** v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, N.P. O uso de um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MSⁿ na prospecção de novos componentes peptídicos do veneno da vespa social *Polybia paulista*. **Dissertação (Mestrado).** Universidade Estadual Paulista. 122p. 2011.

DIAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from Trypanosoma cruzi. **Experientia.** v.44, p. 880-881, 1988.

DYPBUKT, J. M.; ANKARCORONA, M.; BURKITT, M.; SJOHOLM, A.; STROM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **J. Biol. Chem.** v.269, p.30553-30560, 1994.

EDERY, H.; ISHAY, J.; GITTER, S.; JOSHUA, H. In: BETTINI, S. *Venoms of Vespidae. Arthropod venoms*. New York: **Springer-Verlag**. p.691-771, 1978.

FEINSTEIN, W.P.; BRYLINSKI, M. Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets. **Journal of Cheminformatics**. v.7, n.18. 2015.

FIOCRUZ. Pesquisas avaliam eficácia do benzonidazol em pacientes crônicos. Disponível em:http://www.cpqam.fiocruz.br/?option=com_k2&view=item&layout=item&id=1072&Itemid=8 , 2015. Acesso em: 05 de maio de 2015.

FRANCISCO, A.F. Estresse oxidativo, defesas antioxidantes e processo inflamatório na fase aguda da doença de chagas experimental. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Ouro Preto. 2011.

FREITAS, G. C. C.; OLIVEIRA, A. E.; FARIAS, J. E. B.; VASCONCELOS, S. D. Acidentes por aranhas, insetos e centopéias registrados no centro de assistência toxicológica de Pernambuco (1993 a 2003). **Revista de Patologia Tropical**. v.35, p.148-156, 2006.

GARCIA, F. R. M. **Zoologia agrícola: manejo ecológico de pragas**. Ed. Rígel. 248p, Porto Alegre, 1999.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitol Res.** v.88, p.598-602, 2002.

GRIESBACKER, T.; ALTHUBER, P.; ZENZ, M.; RAINER, L.; GRIENGL, S.; LEMBECK, F. *Vespula vulgaris* venom: role of kinins and of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Eur. J. Pharmacol.** v.351, p.95-104, 1998.

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

GUPTA, S.; WEN, J.J.; GARG, N.J. Oxidative stress in Chagas disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v.9. ID 190354. 2009.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**. v.117, p.314-22. 1972.

HALLIWELI, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovas. Res.** v. 47, p.410-418. 2000.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.R. "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform". **Journal of Cheminformatics**. v.4, n.17, 2012.

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

HIGASHIJIMA, T., ROSS, E.M. Mapping of the mastoparan binding site on G proteins. Cross-linking of [125I-Tyr3, Cys11] mastoparan to go. **J. Biol. Chem.** v.266: p.12655–12661, 1991.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; FUJINO, M.; KITADA, C. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chem. Pharm. Bull.** v.27, p.1945–1946, 1979a.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; FUJINO, M.; KITADA, C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 27, n. 8, p. 1942-4, 1979b.

INBEQMEDI. **Doença de Chagas.** Disponível em: <http://www.inbeqmedi.ifsc.usp.br/doencas_de_chagas.php>. Acesso em: 10 Mar 2014.

JI, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exper Biol Med.** n. 222; p. 283-92, 1999.

JOHNSON, L.V.; WALSH, M.C.; CHEN, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JOHNSON, S. R.; COPELLO, J. A.; EVANS, M. S.; SUAREZ, A. V. A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. **Toxicon**. v.55, n4, p702-10, 2010.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov.** v. 3, 11, p. 935-49, 2004.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nature Rev Drug Discov.** v.1, p.748, 2002.

KIRKINEZOS, I.G.; MORAES, C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Semin Cell Dev Biol.** v.12, p.449-457, 2001.

KONNO, K.; HISADA, M.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; KAWAY, N.; MIWA, A.; YASUHARA, T.; MOTIMOTO, Y.; NAKAY, Y. Structure and biological activities of eumenine mastoparan – AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in venom of solitary wasp (*Antenynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**. v. 38, n. 11, p. 1505-1515, 2000.

KONNO, K.; HISADA, M.; FONTANA, R.; LORENZI, C. C. B.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; MIWA, A.; KAWAI, N.; NAKATA, Y.; YASUHARA, T.; RUGGIERO NETO, J.; AZEVEDO, W. F.; PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1550, p.70-80, 2001.

KYOGOKU, Y.; FUJIYOSHI, Y.; SHIMADA, I.; NAKAMURA, H.; TSUKIHARA, T.; AKUTSU, H.; ODAHARA, T.; OKADA, T.; NOMURA, N. Structural genomics of membrane proteins. **Acc. Chem. Res.** v.36, n.3, p.199-206, 2003.

LADAME, S.; CASTILHO SILVA, C.H.T.P.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PÉRIÉ, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. **European Journal of Biochemistry**. v. 270, n.22, p.4574-4586, 2003.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. Pearson Education Limited 2^a ed., 2001.

LEITE, N.B.; COSTA, L.C.; ALVARES, D.S.; CABRERA, M.P.S.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; NETO, J.R. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**. v.40, p. 91–100. 2011.

LESCURE, F.X.; LOUP, G.L.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect.** v.10, p.556–70, 2010.

LIMA, D.B. Potencial antimicrobiano e antiparasitário do veneno da *Dinoponera quadriceps*. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Ceará. p.88, 2014.

LIMA, M. A.P.; de LIMA, J.R.; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sociais (HYMENOPTERA, VESPIDAE) no Campus da UFJF, Juiz de Fora, MG. **Rev. bras. de Zootecias**. v.2 n.1, 2000.

LORENZI, C. C. B. Estudo estrutural de mastoparanos isolado de vespas solitárias. São Jose do Rio Preto, 115p. **Dissertação** (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2002.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR., A. Chagas Heart Disease Pathophysiologic Mechanisms Prognostic Factors and Risk Stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.104, n.1, p.152-158, 2009.

MARSHALL, G.R. **Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view.** In: OPREA, T.I. Chemoinformatics in drug discovery. Weinheim: Wiley – VHC. p. 1-22, 2004.

MATSUZAKI, K.; YONEYAMA, S.; MURASE, O.; MIYAJIMA, K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. **Biochemistry.** v.35, p.8450-6, 1996.

MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T., ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.104, p.263-269, 2009.

MELLOR, I. R.; SANSOM, M. S. Ion-channel properties of mastoparan, a 14-residue peptide from wasp venom, and of MP3, a 12-residue analogue. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.** v.239, n.1296, p.383-400, 1990.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos. **Rev. Virtual Quim.** v.4, n.374-392, 2012.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; PALMA, M. S. Structural and biological of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon.** v.44, p.67-74, 2004.

MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje.** v.5, n.28, p.57-62, 1987.

MERRIFIELD, B. Solid-Phase synthesis. **Science.** v.232, p.341-7, 1986.

MILJANICH, G. P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Curr. Med. Chem.** v. 11, n. 23, p. 3029-3040, 2004.

MINTSERIS, J., PIERCE, B., WIEHE, K., ANDERSON, R., CHEN, R., WENG, Z. Integrating Statistical Pair Potentials into Protein Complex Prediction. **Proteins.** v.69, n.3, p. 511-520, 2007.

MONINCOVÁ, L.; BUDESÍNSKÝ M, SLANINOVÁ J, HOVORKA O, CVACKA J, VOBURKA Z, FUCÍK V, BOROVIKOVÁ L, BEDNÁROVÁ L, STRAKA J, CEROVSKÝ V. Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (Hymenoptera: Halictidae) and their analogs. **Amino Acids.** v.39, n.3, p.763-75, 2010.

MOPAC2012, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. Disponível em: [Http://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net). 2012.

MOREL, C. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 22, n. 8, p. 1522-1523, 2006.

MORTARI, M. R. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic Clin Pharmacology Toxicology**. v.97, n.5, p.289-95, 2005.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol Ther**. v.114, n.1, p.171-183, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

MURATA, K.; SHINADA, T.; OHFUNE, Y.; HISADA, M.; YASUDA, A.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. **Biol. Pharm. Bull**. v. 29, n. 12, p. 2493-2497, 2006.

NAKAJIMA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, K.; SAITO, K.; MIYAZAWA, T.; YASUHARA, T.; TSUKAMOTO, Y.; FUJINO, M. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**. v.25, p.115-21, 1986.

NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, T.; FUKUDA, K.; SUKAMOTO, T. Wasp Kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptides**. v.6, p.425-430, 1985.

OLIVA, G. Bioinformática: Perspectivas na Medicina. **Gazeta Médica da Bahia**. v.78, p 52-58. 2008.

OLIVEIRA, M. R. P. Efeitos do veneno bruto de *Polybia (Mirapetra) paulista* (LEHRING, 1896) em camundongos: estudos bioquímicos, farmacológicos e morfológicos. Rio Claro, 135p. **Tese (Doutorado)**. Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2000.

ORIVELL, J.; REDEKER, V.; CAER, J. P.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A.; LONGEON, A.; CHAFFOTTE, A.; DEJEAN, A.; ROSSIER, J. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. **J Biochem Chem**. v.286, p.17823-17829, 2001.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M.S.; PUPO, M.T.; DIAS, R.L.A.; CORREA, A.G.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G. 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, p.13-17, 2002.

PEDRA, R.A.; OLIVEIRA, R. A.; BEYRODT, C.G.P.; FRANÇA, H.H. Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de chagas na fase crônica. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**. v. 13, n. 2, p. 5-9, 2011.

PEREIRA, A.A.M. Estudo das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-gosfogluconato desidrogenase e triparedoxina peroxidase em duas cepas de *Trypanosoma cruzi* com diferentes resistências ao estresse oxidativo. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas. 2003.

PEREIRA, B.C.; PEREIRA, A.K.F.C. Radicais livres: uma nova abordagem. **Revista Saúde Quântica**. v.1, n.1. 2012.

PERIANIN, A.; SNYDERMAN, R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol trisphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol**. v.143, p.1669–1673, 1989.

PETHERICK, A. After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease. **Nature Medicine**. v.17, p. 1174. 2011.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera -a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**. v.25, p.1605-1612. 2004.

PIERRI, C. L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Computational approaches for protein function prediction: A combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**. v. 1804, 9, p. 1695-1712, 2010.

PIERCE, B.G.; HOURAI, Y.; WENG, Z. Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. **PLoS One**. v.6, n.9, 2011.

PIERCE, B.G.; WIEHE, K.; HWANG, H.; KIM, B.H.; VREVEN, T.; WENG, Z. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. **Bioinformatics**. v.30, p.1771-1773, 2014.

PIÑEYRO, M.D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**. n.408(1-2): p.45-50, 2008.

PROKOPCZYK, I.M.; RIBEIRO, J.F.; SARTORI, G.R.; SESTI-COSTA, R.; SILVA J.S.; FREITAS R.F.; LEITÃO A.; MONTANARI, C.A. Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors. **Future Med Chem**. v.6, n.17-33, 2014.

PYRKOV, T.; OZEROV, I.; BALITSKAYA, E.; EFREMOV, R. Molecular docking: The role of noncovalent interactions in the formation of protein-nucleotide and protein-

peptide complexes. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**. v. 36, 4, p. 446-455, 2010.

RANGEL, M.; CABRERA, M.P.; KAZUMA, K.; ANDO, K.; WANG, X.; KATO, M.; NIHEI, K.; HIRATA, I.Y.; CROSS, T.J.; GARCIA, A.N.; FAQUIM-MAURO, E.L.; FRANZOLIN, M.R.; FUCHINO, H.; MORI-YASUMOTO, K.; SEKITA, S.; KADOWAKI, M.; SATAKE, M.; KONNO, K. Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. **Toxicon**. v.57, p.7-8, 2011.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **The Lancet**. v.375, p.1388-1402, 2010.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin N AM**. v.26, p.275-29, 2012.

REIS, M.; ALVES, C.N.; LAMEIRA, J.; TUÑÓN, I.; MARTÍ, S.; MOLINER, V. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* elucidated via the QM/MM approach. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v.15, p. 3772-3785. 2013.

REY, L. **Bases Da Parasitologia Médica**. 3ª Edição, Editora Saraiva, Rio de Janeiro, 2011.

RIBEIRO, S. P.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; AZEVEDO, W. F.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**. v.25, p. 2069–2078, 2004.

ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J Infect Dis**. v. 186, n.6, p.823-8, 2002.

RUBEN, L.; AKINS, C. D.; HAGHIGHAT, N. G.; XUE, L. Calcium influx in *Trypanosoma brucei* can be induced by amphiphilic peptides and amines. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 81, Issue 2, p. 191–200. 1996.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.A.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G.; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. New Bioactive Coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **J. Nat. Prod.** v. 66, p. 634-637, 2003.

SCHWRZ, G.; BLOCHMANN, U. Association of the wasp venom peptide mastoparan with electrically neutral lipid vesicles. **FEBS Letters**. v.318, n.2, p.172-6, 1993.

SEIDLER, N. W. GAPDH: Biological Properties and Diversity. **Springer**. 21-24, 2013.

SHEN, X.; YE, G.; CHENG, X.; YU, C.; ALTOSAAR, I.; HU, C. Characterization of an abaecin-like antimicrobial peptide identified from a *Pteromalus puparum* cDNA clone. **J Invertebr Pathol.** v.105, n.1, p.24-9, 2010.

SHIMIZU, H. **Doença de Chagas atinge países desenvolvidos - 21/03/2013.** Disponível em : <<http://agencia.fapesp.br/17002>>. Acesso em 25/02/14.

SILVA, C. F.; MEUSER, M.B.; DE SOUZA, E. M.; MEIRELLES, M. N.; STEPHENS, C. E.; SOM, P.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.51, p.3803-3809, 2007.

SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes.** USP- Ribeirão Preto, 2008.

SILVEIRA, A.C.; VINHAES, M.C., 1998. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.31, p.15-60, 1998.

SMAILI, S.S.; HSU, Y.T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 36, p. 183-190, 2003.

SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; MENDES, M. A.; PALMA, M.S. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v.18, p.1095–1102, 2004.

SOUZA, D.H.F.; GARRATT, R.C.; ARAÚJO, A.P.U.; GUIMARAES, B.G.; JESUS, W.D.P.; MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letts.** v.424, p.131-135, 1998.

SOUZA, B.M.; MENDES, M.A.; SANTOS, L.D.; MARQUES, M.R.; CESAR, L.M.; ALMEIDA, R.N.; PAGNOCCA, F.C.; KONNO, K.; PALMA, M.S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides.** n. 26, v.11, p.2157-64, 2005.

SOUZA, B.M. Estrutura e função de Mastoparanos dos venenos de vespas. **Tese (Doutorado).** Programa de pós-graduação em ciências biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências – Rio Claro. 2006.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SHUWARTZ, R. A. Insect sting reactions to bees, wasps and ants. **Int. J. Dermatol.** v.44, p.91-94, 2005.

TIAN, C.; GAO, B.; FANG, Q. YE, G.; ZHU, S. Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. **BMC Genomics.** v.19, p.11-187, 2010.

TOMAZELA, D.M. Pyrano chalcones and a flavone from *Neuraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochemistry**. v.55, p. 643-651, 2000.

TOOZE, S.A. Current views on the source of the autophagosome membrane. **Essays. Biochem.** v. 55, p. 29-38, 2013.

TURRENS, J.F.; WATTS Jr., B.P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma Cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Mol Biochem Parasitol**. v.82, p.12-9. 1996.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol Aspects Med**. v.21, p. 211-20. 2004.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**. v.115, p.55–68. 2010.

VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO M.T.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVAO, F. "Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales". **Pure Appl. Chem**. v. 73, n.3, p.617-622, 2001.

VERLINDE, C.L.M.J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J.J.; FOTHERGILL-GILMORE, L.A.; OPPERDOES, F.R.; GELB, M.H.; HOL, W.G.J.; MICHELS, P.A.M. Glycolysis as a target for the desing of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updades**. v.4, n.1, p. 50-65, 2001.

VILLAS BÔAS GK, GADELHA CAG. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cad Saude Publica**. v. 23, p.1463-71, 2007.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v.7, n.2, p.157-163, 2009.

WANG, K.; YAN, J.; CHEN, R.; DANG, W.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; SONG, J.; WANG, R. Membrane-active action mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.56, p.3318-23, 2012.

WANG, K.; YAN, J; DANG,W.; LIU, X.; CHEN, R.; ZHANG, J.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; KAI, M.; YAN, W.; YANG, Z.; XIE, J.; WANG, R. Membrane active antimicrobial activity and molecular dynamics study of a novel cationic antimicrobial peptide polybia-MPI, from the venom of *Polybia paulista*. **Peptides**. v.39, p.80–88, 2013.

WHO - World Health Organization. First who report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 184p. Geneva: 2010.

WHO - World Health Organization. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. 22p. 2012.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet, n.340. 2015.

WILKINSON, S.R.; KELLY, J.M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev Mol Med.** v.11, 2009.

YE, J.; ZHAO, H.; WANG, H.; BIAN, J.; ZHENG, R.A. defensin antimicrobial peptide from the venoms of *Nasonia vitripennis*. **Toxicon.** v.56, n.1, p.101-6, 2010.

YORDANOVA, Z. P.; WOLTERING, E.J.; KAPCHINA-TOTEVA, V.M.; AKIMOVA, A.T. Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Annals of Botany.** n.111, p.191-205, 2013.

ZACKS, M.A.; WEN, J.J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **An Acad Bras Cienc.** v.77, p.695–715, 2005.

ANEXO

The potential trypanocidal effect of mastoparan isolated from the *Polybia paulista* wasp venom

Juliana F.C. Vinhote¹, Danya B. Lima², Clarissa P. Mello², Ramon R.P.P.B. Menezes¹, Alexandre Havt¹, Mario S. Palma³, Eudencilson L. Albuquerque⁴, Valder N.Freire⁵, Ricardo P. Santos⁶, Alice M.C. Martins².

¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

²Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil;

³Institute of Biosciences of Rio Claro, São Paulo State University;

⁴Department of Biophysics and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil;

⁵Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

⁶Computer Engineering, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil.

* Corresponding author; Tel : +55 85 3366-8269

E-mail : martinsalice@gmail.com

Address: Capitão Francisco Pedro 1210 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará , Brazil

Abstract

Chagas disease (CD), considered a neglected disease, is a parasitic infection caused by *Trypanosoma cruzi*, which is endemic throughout the world. Only two drugs are used in patients for the treatment of this disease; however, these drugs are ineffective in its chronic phase. Studies carried out with Hymenoptera venoms have shown trypanocidal activity, which may further contribute to research of new drugs. Thus, this study investigated the trypanocidal potential of the peptide mastoparan (MP), isolated from *Polybia paulista* wasp venom, and its binding to tcGAPDH as a possible mechanism of action. In antiparasitic assays, the cytotoxic effects of the venom were observed on epimastigote forms after 48 hours and trypomastigote forms of *T. cruzi* Y strain after 24 hours, with an IC₅₀ of 42.4 mg/mL and IC₅₀ of 8.83 µg/mL, respectively. The molecular docking pose suggested the inhibition of *TcGAPDH* enzyme by MP. This pose seems to be similar to that occupied by chalepin molecule in *TcGAPDH*, acting over amino acid residues from the active center of the enzyme. This interaction may interference in the catalytic mechanism of GAPDH oxidoreductase activity. In conclusion, mastoparan isolated from *Polybia paulista* wasp venom presents trypanocidal effect over epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Additionally, this peptide appears to inhibit *TcGAPDH*, an enzyme involved in oxirreductive mechanism in *T.*

cruzi. This paper opens perspectives for understanding the action of bioactive substances over *T. cruzi* metabolism pathways.

Key words: Antiparasitic agents, molecular docking, wasp venom; mastoparan.

1. INTRODUCTION

Chagas disease (CD), caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite, is endemic worldwide (WHO, 2010) and considered a neglected disease (WHO, 2012, Rassi, 2012). Even though, according to the World Health Organization (WHO), approximately 7.7 to 10 million individuals are chronically infected with *T. cruzi* and between 10,000 and 14,000 deaths are attributed to CD each year. In Brazil, 1,087 cases of acute CD were recorded between the years 2000 and 2010 (Brasil, 2010), but scientific studies indicate that there are 2 to 3 million infected individuals (Ramos, et al., 2010). In the State of Ceará, Brazil, where this work was done, an outbreak of acute CD was verified in a single municipality in the state in 2006 (Cavalcanti, et al., 2009) and new data showed an increased rate of infection in triatominae between 2009 and 2011 (Vasconcelos, 2013; Freitas, 2011).

Only two drugs are used in patients with CD for the treatment of this disease, nifurtimox and benznidazole. However, these drugs are ineffective in the chronic phase of the disease and have marked side effects (Cançado, 2002; Coura, 2007; Coura 2011; Araujo-Jorge, 2014). The action of trypanocidal drugs is generally not well understood (Díaz-Urrutia, 2012). The inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Trypanosoma cruzi* (*TcGAPDH*) has been proposed as one of the mechanisms of this action (Bakker, et al., 2000; Ladame, 2003; Prokopczyk, et al., 2014). The *TcGAPDH* converts glyceraldehyde 3-phosphate into D glycerate 1,3-bisphosphate in the presence of NAD^+ and inorganic phosphate, important for the parasite's life cycle (Harris, 1976; Nowicki, et al., 2008; Soares, et al., 2013; Zinsser, et al., 2014). For instance, studies performed with chalepin (a furanocoumarin isolated from species of the Rutaceae family) showed that this substance has high trypanocidal action ($\text{IC}_{50} = 64 \mu\text{g mL}^{-1}$) and inhibitory effect on *TcGAPDH* (Pavão, 2002).

The use of animal venoms has raised considerable interest as potential sources of bioactive substances, as the isolated molecules can promote prototypes for the creation of biopharmaceuticals. We have previously demonstrated the trypanocidal activity of Hymenoptera venoms (Adade et al., 2012; Adade et al., 2013). Studies with peptides isolated from wasp venom, such as mastoparan, have shown antimicrobial activity (Mendes et al., 2004).

Thus, the discovery of new substances with trypanocidal activity can be used as a molecular model for the design of new drugs for the treatment of Chagas disease. In this context, we evaluated the trypanocidal potential of mastoparan peptide (MP) isolated from the *Polybia paulista* wasp venom, aiming to discover a substance of therapeutic value. We also performed molecular docking of MP in the active site of *Tc*GAPDH and compared it with *Tc*GAPDH-Chalepin complex to study its possible action mechanism.

2.MATERIALS AND METHODS

2.1 *Trypanosoma cruzi* and Chemicals

The mastoparan peptide (MP) isolated from *Polybia paulista* wasp venom with the primary sequence IDWLKLGKMVMDVL was kindly provided by Dr. Mario Palma (Universidade de São Carlos, São Paulo, Brazil). Benznidazole (BZ) was donated by LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of the state of Pernambuco). DMEM medium, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The *Trypanosoma cruzi* strain Y was kindly donated by Chemistry Laboratory from Biochemistry Institute of São Paulo University- USP, São Paulo, Brazil.

2.1 Effect of mastoparan isolated from *Polybia paulista* venom on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

The epimastigote forms of *T. cruzi* strain Y were cultured in 96-well plates at a density of 1×10^6 parasites/mL, maintained in *Liver Infusion Tryptose* (LIT) medium supplemented with antibiotics and 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) and incubated at 28°C. Aliquots of different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) of MP were added to the parasite suspension. The plate was incubated for 48 hours in culture conditions. Sterile PBS was used as negative control (pH 7.4). Parasite movement was observed under an inverted microscope (100x) and growth inhibition was determined by quantification in a Neubauer chamber (Abe, 2002; Gonçalves et al, 2002). Untreated cultures represented 100% of growth and IC50 was determined according to the Probit regression analysis model.

2.2 Effects of mastoparan isolated from *Polybia paulista* venom on tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

The tripomastigote forms of *T. cruzi* obtained by infecting LLCMK2 cells were subcultured in 96-well plates at a density of 1×10^6 parasites/mL and incubated at 37 °C in an

atmosphere with 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with antibiotics and 2% of FBS (Aparicio et al., 2004). Aliquots of different concentrations (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL) of MP were added to the parasite suspension. The plate was incubated for 24 hours in culture conditions. Untreated cultures of the parasite were considered as 100% viability and IC₅₀ value (concentration that kills 50% of the parasites) was calculated. The assays were performed in triplicate in three independent experiments (Abe, 2002; Gonçalves et al, 2002).

2.3 Statistical analysis

Values were expressed as mean ± S.E.M. Statistical comparisons were performed using the GraphPad Prism 5 program through ANOVA with Dunnett's post-test and differences with P <0.05 were considered statistically significant.

2.4 Molecular Docking

Initially, we obtained the MP peptide three-dimensional structure starting from the primary sequence IDWLKLGKVMVDVL (Souza, 2006) in Avogadro 1.1.1 program (Hanwell, 2012). After that, we performed the geometric optimization of the structure through semiempirical quantum chemistry calculations using the MOPAC2012 program (<http://openmopac.net>), adopting the semiempirical Hamiltonian PM7. The crystallographic structure of the *Tc*GAPDH-chalepin complex was obtained from RCSB Protein Data Bank (PDB code: 1K3T) elucidated by Pavão *et al.* (2002). To identify potential binding sites, molecular docking was carried out employing automated docking in a ZDOCK server (<http://zdock.umassmed.edu/>) with the ZDOCK 3.0.2 program (Pierce, 2014). ZDOCK is a Fast Fourier Transform-based docking program that searches all possible binding modes in the translational and rotational space between protein-peptide (Pierce, 2011). Each pose was evaluated by an energy-based scoring function consisting of IFACE statistical potential, shape complementarity, and electrostatic terms (Mintseris, 2007). The ligand used was the optimized MP and the target was the *Tc*GAPDH enzyme after the removal of the chalepin of the *Tc*GAPDH–chalepin complex. We defined a region of interest (binding site) formed by residues of the active center of the enzyme (Seidler, 2013). ZDOCK predictions were filtered using the residues of the binding site and a 6 Å distance cutoff. The best MP pose was selected based on the best-ranked conformation of the ligand (peptide) in the target (enzyme), and used for the construction of *Tc*GAPDH-MP complex. The *Tc*GAPDH-chalepin complex was used to compare the position of the ligand in the binding site. Molecular graphics were

performed using the UCSF Chimera 1.8 package (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco) (Pettersen, 2004).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* cultures were treated with different concentrations of mastoparan peptide for 48 hours and a concentration-dependent cytotoxic effect was observed, with IC_{50} of 47,49 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1).

For the trypomastigote forms, the cytotoxicity was assessed after 24h of incubation and also showed concentration-dependent inhibited growth, with IC_{50} of 8.83 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2).

Studies with substances of animal origin have contributed a great deal to the understanding of vascular and neurological diseases, inflammatory processes, analgesia and allergic processes, among others (Mortari et al., 2007). In this sense, considering the scarce number of pharmacological agents used in Chagas disease, studies with biological active substances have sought more effective drugs with fewer side effects to be used in the treatment of patients at different stages of the disease.

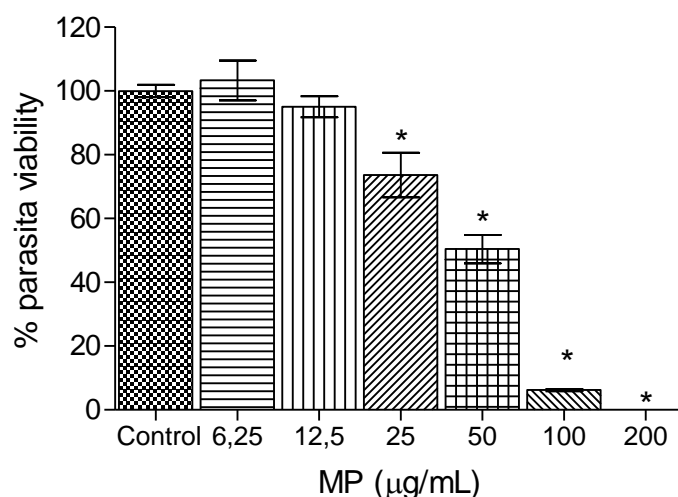


Fig 1. Cytotoxic effects of Mastoparan from *P. Paulista* venom (MP) on epimastigote forms of *T. cruzi* after 48h of incubation. Datas were expressed as mean \pm E.P.M (n=3) and analyzed by ANOVA with Dunett's post-test, *p < 0.05 compared to the corresponding control group.

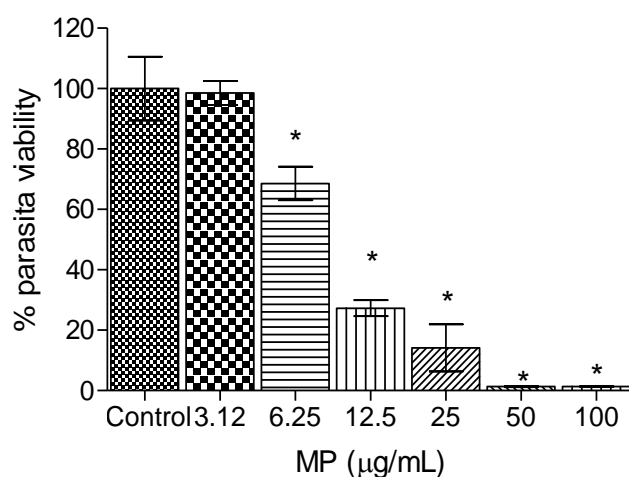


Fig 2. Cytotoxic effects of Mastoparan from *P. Paulista* venom (MPVP) on tripomastigote forms of *T. cruzi* after 24h of incubation. Data were expressed as mean \pm E.P.M (n=3) and analyzed by ANOVA with Dunett's post-test, *p < 0.05 compared to the corresponding control group.

Antimicrobial peptides have certain characteristics that make them attractive alternatives to conventional therapies. This is due to their rapid mode of action and low probability of developing resistance (Zasloff, 2002).

It has been previously demonstrated that antimicrobial peptides such as mastoparan showed a high level of toxicity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungi, viruses, metazoan parasites and even cancer cells (Zasloff, 2002; Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

Our study demonstrated the trypanocidal activity of the MP peptide on the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* Y strain. Corroborating to our findings, other authors have shown the trypanocidal effect of Hymenoptera venoms (Adad *et al.*, 2012; 2013), as well as of *Apis mellifera* bee venom and the mellitin peptide.

The molecular docking analysis was used to suggest a possible mechanism of action of the peptide on the parasite through the study of the interaction between *Tc*GAPDH and the MP. The MP best-ranked pose in the docking simulation is shown in figure 3, together with the chalepin pose (obtained from crystallographic data of *Tc*GAPDH–chalepin complex) for comparison. We can observe that the docking pose of MP peptide is similar to that occupied by the chalepin molecule in the *Tc*GAPDH active site.

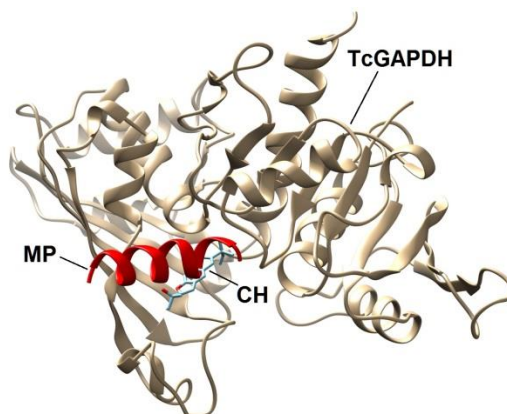


Fig. 3. Molecular docking of MP peptide with highest score (red helix) in the *TcGAPDH* enzyme. The chalepin (CH) pose obtained from crystallographic data of *TcGAPDH*–chalepin complex is also shown for comparison. Side chains of the residues of the peptide are not shown.

The region of nearest neighbors between MP peptide and the atoms of amino acid residues of the binding site is shown in figure 4. We considered residues with distances $< 3.5 \text{ \AA}$ from ligand atoms. This region consists of the following residues: Ala135,164,198,228,231; Arg249; Asp210; Cys166; Gln200; Gly227,245; His194; Ile13; Leu130; Lys209,230; Met246; Pro136; Ser134,165,224,247; Thr115,167,168,197,199,225,226,244; and Tyr333,339. According to Seidler (2013), Arg249, Asp210, Cys166, His194, Ser165, Thr197,226, and Tyr333 residues play a significant role at the active enzyme center. These residues participate in the catalytic mechanism of GAPDH oxidoreductase activity.

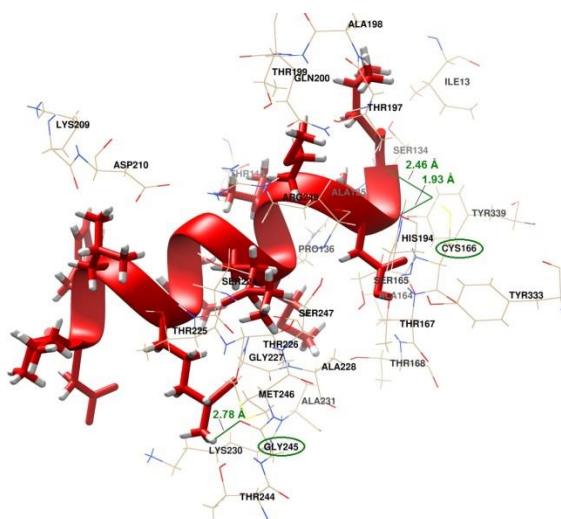


Fig. 4. Nearest amino acids residues with contact distance $< 3.5 \text{ \AA}$ (wire) of MP peptide with highest score (red helix and stick) in the binding site of *TcGAPDH* enzyme. Inter-molecular H-bonds (green lines) between the peptide and Cys166 and Gly245 residues (green ellipses) of enzyme are shown. Lengths of H-bonds are also indicated. The Cys166 is an important catalytic residue that plays a significant role at the active center of enzyme.

We observed that the MP peptide and the *Tc*GAPDH can form three H-bonds: two involving Cys166 of *Tc*GAPDH with Val13 and Asp12 of MP; and other involving Gly245 of *Tc*GAPDH with Lys5 of MP. H-bonds are important in interactions between ligand and the enzyme, especially with *Tc*GAPDH catalytic residues, such as the Cys166 (Seidler, 2013). Souza et al (1998) suggest that the Asp210 residue may be involved in selective inhibition processes. For instance, chalepin inhibits *Tc*GAPDH, but does not inhibit the human GAPDH. The substitution of Asp210 (*T. cruzi*) by Leu194 (human) can produce less effective polar interactions, decreasing chalepin specificity for the human GAPDH (Pavão, 2002). Thus, the peptide pose with highest score obtained from the molecular docking with *Tc*GAPDH suggests the possibility of inhibition of this enzyme. This could be a mechanism for the biological action of the peptide on the parasite.

In conclusion, mastoparan isolated from *Polybia paulista* wasp venom showed inhibitory effect on the epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* strain Y. Additionally, we suggest a possible interaction of the peptide with *Tc*GAPDH. The present study opens perspectives for future studies searching for molecular models for the treatment of Chagas disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP).

4. REFERENCE

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R. 2002. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull.* 25, 1188-1191.
- Adade, C. M., Chagas, G. S., Souto-Pradrón, T. 2012. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 11, 1444-61.
- Adade, C. M., Oliveira, I. R., Pais, J. A., Souto-Pradrón, T. 2013. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon.* 69, 227-39.

Aparicio, I.M., Scharfstein, J., Lima, A.P.C.A. 2004. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infection and Immunity* 72, 5892-5902.

Araujo-Jorge, T. 2014. Doença de Chagas. <https://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>.

Bakker, B.M.; Westerhoff, H.V.; Opperdoes, F.R.; Michels, P.A.M. 2000. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106, 1-10.

Brasil. Ministério da Saúde, 2010. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Revista Saúde Pública*, São Paulo, 44, 200-202.

Cançado, J. R., 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 44, 29-37.

Cavalcanti, L.P.G., Rolim, D.B., Neto, R.J.P., Vilar, D.C.L.F., Nogueira, J.O.L., Pompeu, M.M.L., 2009. Microepidemia de doença de chagas aguda por transmissão oral no ceará. *Cad Saúde Coletiva.* 17, 911-921.

Coura, J. R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102, 113-122.

Coura, J.R., Borges-Pereira, J., 2011. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106, 641-645.

Díaz-Urrutia C.A., Olea-Azar, C. A., Zapata, G. A., Lapier, M., Mura, F., Aquilera-Venegas, B., Arán, V.J., López-Muñoz, R.A., Maya, J.D., 2012. Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 95, 670-678.

Freitas, E.C., 2011. Inquérito soroprevalenciológico da Doença de Chagas na comunidade de Sapé, zona rural de Limoeiro do Norte, Ceará. Monografia (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal do Ceará. 44f.

Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform" *Journal of Cheminformatics*, 4:17.

Harris, J. I. & Waters, M. (1976) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) *Academic Press, New York* . 13, 1–49.

Hoskin, D.W., Ramamoorthy, A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 357–375.

[Http://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net). MOPAC, 2012. James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA.

Ladame, S., Castilho, M.S., Silva, C.H.T.P., Denier, C., Hannaert, V., Périé, J., Oliva, G., Willson, M. 2003. Crystal structure of Trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. *Eur. J. Biochem*, 270, 4574-4586.

Mendes, M. A., De Souza, B. M., Marques, M. R., Palma, M. S., 2004. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon*. 44, 67-74.

Mintseris, J., Pierce, B., Wiehe, K., Anderson, R., Chen, R., Weng, Z., 2007. Integrating Statistical Pair Potentials into Protein Complex Prediction. *Proteins* 69(3): 511-520.

Mortari, M.R., Cunha, A.O., Ferreira, L. B., Dos Santos, W.F., 2007. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther*. 114, 171-183.

Nowicki, M.W., Tulloch, L.B., Worrall, L., Mcnae, I.W., Hannaert, V., Michels, P.A.M.; Fothergill-Gilmore, L.A.; Walkinshaw, M.D.; Turner, N.J., 2008. Design, synthesis and trypanocidal activity of lead compounds based on inhibitors of parasite glycolysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 5050-5061.

Pavão, F., Castilho, M.S., Pupo, M.T., Dias, R.L.A., Correa, A.G., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Mafezoli, J., Vieira, P.C., Oliva, G., 2002. Structure of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. *FEBS Letters*. 520, 13-17.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera -a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25, 1605-1612.

Pierce, B.G., Hourai, Y., Weng, Z., 2011; Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. *PLoS One*. 6(9): e24657.

Pierce, B.G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.H., Vreven, T., Weng, Z., 2014. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. *Bioinformatics* 30, 1771-1773.

Prokopczyk, I.M., Ribeiro, J.F., Sartori, G.R., Sesti-Costa, R., Silva J.S., Freitas R.F., Leitão A., Montanari, C.A., 2014. Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors. *Future Med Chem*. 6, 17-33.

Ramos JR, A.N., Martins-Melo, F.R., Barbosa, J.C., Heukelbach, J., 2010. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 12–17

Rassi J.R.A., Rassi, A., Marcondes De Rezende, J., 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 26, 275–291.

Seidler, N.W., 2013. *GAPDH: Biological Properties and Diversity*. Springer, New York. 21-24.

Soares, F.A., Sesti-Costa, R., Silva, J.S., Souza, M.C.B.V., Ferreira, V. F., Santos, F.C., Monteiro, P.A.U., Leitão, A., Montanari, C.A., 2013. Molecular design, synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydro-4-oxoquinoline ribonucleosides as TcGAPDH inhibitors with trypanocidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23, 4597-4601.

Souza, B.M., 2006. Estrutura e função de Mastoparanos dos venenos de vespas. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em ciências biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências – Rio Claro.

Vasconcelos, A.S.O.B., 2013. Índice de Infestação e infecção de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi* na região sudoeste do Estado do Ceará. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará. 75f.

Who - World Health Organization., 2012. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. 22p.

Who - World Health Organization., 2010. First who report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 184p.

Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415, 389–395

Zinsser, V.L., Hoey, E.M., Trudgett A., Timson, D.J., 2014. Biochemical characterisation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biochim Biophys Acta*. 44, 744-749.