



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

**MARÍLIA LOPES MONTEIRO**

**EFEITO ANTICHAGÁSICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA HEMOCIANINA DO  
CAMARÃO *Penaeus monodon*.**

**FORTALEZA**

**2019**

MARÍLIA LOPES MONTEIRO

EFEITO ANTICHAGÁSICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA HEMOCIANINA DO  
CAMARÃO *Penaeus monodon*.

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

**FORTALEZA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

M778e Monteiro, Marília Lopes.  
EFEITO ANTICHAGÁSICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA HEMOCIANINA DO  
CAMARÃO *Penaeus monodon*. / Marília Lopes Monteiro. – 2019.  
107 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Hemocianina. 4. *Penaeus monodon*. I.  
Título.

CDD 615.1

---

MARÍLIA LOPES MONTEIRO

EFEITO ANTICHAGÁSICO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA HEMOCIANINA DO  
CAMARÃO *Penaeus monodon*.

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de qualificação de mestrado em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Defesa em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Maria Jania Teixeira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Carolina Sidrim De Paula Cavalcante  
Universidade Federal do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus avós e minha mãe

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por toda força e coragem que continua me proporcionando ao longo desses anos e por ter colocado em meu destino anjos em forma de seres humanos para facilitar a minha jornada, seja ela na vida pessoal ou na pós-graduação.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins por ser uma excelente orientadora que me auxiliou durante todo o período do mestrado. Além de proporcionar conversas pessoais que me ajudaram muito a crescer como profissional e principalmente como pessoa.

Ao Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista por ter cedido gentilmente os peptídeos do estudo em questão e por toda sua atenção e orientação para a elaboração deste trabalho.

À minha mãe, Geórgia Lopes e Silva que sempre com muito esforço nunca deixou faltar nada para o meu crescimento pessoal e intelectual. Mulher forte que praticamente sozinha teve a coragem de me educar.

Aos meus avós, pessoas mais importantes em minha vida, que auxiliaram minha mãe em minha criação oferecendo todo o suporte necessário. Meu avô que foi e é um pai, e a minha vó sendo uma grande e amorosa matriarca da nossa família, aos meus tios, tias e primos por toda sua paciência com os meus estresses ao longo desses dois anos de pós-graduação, de sempre entenderem a minha necessidade de estudar ao invés de muitas vezes lhe dar atenção.

Ao meu namorado, Lucas Soares Chagas que me apoia absolutamente em tudo, que durante esses dois anos de mestrado veio inúmeras vezes comigo, com toda paciência do mundo, no laboratório, onde me observava e ajudava a realizar diversos experimentos. Por ter escutado meus medos, minhas angústias, minhas alegrias com este trabalho, sempre me apoiando e me dando forças para não desistir e ir em busca dos meus sonhos e objetivos.

Ao Laboratório de Pesquisa Renal e Doenças Tropicais e todos os seus integrantes por terem me recepcionado tão bem quando eu precisei, por toda ajuda e ensinamentos que me ofereceram, por todos os laços de amizade criados, em especial gostaria de agradecer a Louise Tessarolo Donadello por ter me ensinado diversos protocolos, a Dânya Bandeira Lima e ao Ramon Róseo Paula Pessoa

Bezerra de Menezes por terem auxiliado com todo carinho possível na reta final de trabalho e por terem me auxiliado cientificamente.

Aos meus colegas de mestrado, Gabriela Freire Bezerra, Mariana Maciel Cavalcanti e Gisele Pinheiro e por todos os momentos de amizade, companheirismo e cumplicidade.

Aos funcionários do prédio de Farmácia por toda a ajuda e suporte oferecido.

Às minhas amigas da vida Dorothéia Teixeira e Juliana de Oliveira, por todos os almoços, conversas e choros sobre os experimentos. Nós somos um trio inseparável, espero que para a vida inteira.

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

Ao Pitoco, meu cachorrinho lindo, que sempre ficou do meu lado lendo os artigos, virando noites e me dando carinho.

Às bancas examinadoras de qualificação e de defesa desta dissertação, pela atenção, tempo disponibilizado, críticas e sugestões recebidas.

“A felicidade é a combinação de sorte e escolhas bem-feitas”.

(Martha Medeiros).



## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é responsável pela infecção de milhões de pessoas em cerca de 21 países, e responsável pelo maior número de óbitos entre as doenças parasitárias. Apesar de possuir grandes impactos sociais e econômicos no Brasil o único medicamento utilizado para o tratamento é o benzonidazol, este possui uma eficácia limitada e alta toxicidade. O presente trabalho tem como objetivo investigar a atividade antichagásica de fragmentos derivados da hemocianina do camarão *Penaeus monodon* com potencial antimicrobiano (Hmc666-678, Hmc364-382, Hmc185-197 e Hmc476-498), bem como investigar sua seletividade e mecanismo de ação. A citotoxicidade dos peptídeos foi avaliada em células LLC-MK2 pelo método do MTT. Foi observado efeito citotóxico a partir da concentração de 50µM. Posteriormente, foi investigado o efeito dos peptídeos sobre as formas epimastigotas nos tempos de 24, 48 e 72 horas por contagem em câmara de Neubauer, encontrando para Hmc666-678 IC<sub>50</sub>/24h = 4,01µM; IC<sub>50</sub>/48h = 4,86 µM; IC<sub>50</sub>/72h = 8,83 µM, para Hmc364-382 IC<sub>50</sub>/24h = 4,79µM; IC<sub>50</sub>/48h = 4,5 µM; IC<sub>50</sub>/72h = 11,27 µM, para Hmc185-197 IC<sub>50</sub>/24h = 34,14µM; IC<sub>50</sub>/48h = 86,06 µM; IC<sub>50</sub>/72h = 90,86 µM e para Hmc476-498 IC<sub>50</sub>/24h = 24,22µM; IC<sub>50</sub>/48h = 25,63 µM; IC<sub>50</sub>/72h = 22,13 µM. Em tripomastigotas o efeito foi avaliado no tempo de 24 horas por contagem em câmara de Neubauer, onde Hmc666-678, Hmc364-382 possuem efeito inibitório em quase todas as concentrações testadas de maneira semelhante,. Foi estimado índice de seletividade (IS), onde o peptídeo Hmc364-382 possui o IS acima de 55,24, Hmc666-678 possui o IS acima de 45,35, Hmc476-498 possui o IS 1,99 e Hmc185-197 IS de 1,27. Baseado no índice de seletividade os Hmc666-678, Hmc364-382 foram selecionados para os ensaios posteriores. Também foi encontrado efeito contra formas amastigota após 24 horas de incubação para ambos os peptídeos nas concentrações IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/2</sub> e 2xIC<sub>50</sub> e não foi observado uma redução no percentual de células infectadas. Na busca sobre o mecanismo de ação dos peptídeos selecionados as alterações ultraestruturais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 24 horas de incubação e de transmissão (MET) após 12 de incubação. Efeitos sobre a integridade da membrana plasmática (marcação por 7-aminoactinomycin D), externalização de fosfatidilserina (marcação por AX), espécies reativas de oxigênio (marcação pela forma oxidada de 2'-7'-diclorofluoresceína) e potencial transmembrânico mitocondrial (marcação por rodamina 123) foram avaliados através citometria de fluxo. Os resultados de MET indicam indícios autofágicos, enquanto que MEV e a citometria indicam necrose e apoptose tardia. Sugerindo um início autofágico e progressão para apoptose e necrose. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M e analisados utilizando ANOVA com *Bonferroni's post-test* no programa GraphPad Prism 5. Em conclusão, os quatro peptídeos avaliados mostraram potencial antichagásico e Hmc666-678, Hmc364-382 apresentam efeito promissor, com efeito sobre todas as formas evolutivas de *T. cruzi* e IS acima de 45 com envolvimento de necrose, autofagia e apoptose em seu mecanismo de ação.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Hemocianina; *Penaeus monodon*;

## ABSTRACT

ANTICHAGASIC EFFECT OF PEPTIDE DERIVED FROM SHRIMP HEMOCYANIN  
*Penaeus monodon*.

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is responsible for the infection of millions of people in about 21 countries, responsible for the highest number of deaths among parasitic diseases. Although it has major social and economic impacts in Brazil, the only drug used for treatment is benznidazole, which has limited efficacy and high toxicity. The aim of the present work is to investigate the antichagasic activity of hemocyanin-derived fragments of *Penaeus monodon* shrimp with antimicrobial potential (Hmc666-678, Hmc364-382, Hmc185-197 and Hmc476-498), as well as to investigate their selectivity and mechanism of action. Cytotoxicity of the peptides was evaluated in LLC-MK2 cells by the MTT method. A cytotoxic effect was observed from the 50 $\mu$ M concentration. Subsequently, the effect of the peptides on the epimastigote forms was investigated at 24, 48 and 72 hours by counting in a Neubauer chamber, finding for Hmc666-678 IC<sub>50</sub> / 24h = 4.01 $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 48h = 4.86  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 72h = 8.83  $\mu$ M, for Hmc364-382 IC<sub>50</sub> / 24h = 4.79 $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 48h = 4.5  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 72h = 11.27  $\mu$ M, for Hmc185-197 IC<sub>50</sub> / 24h = 34.14 $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 48h = 86.06  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 72h = 90.86  $\mu$ M and for Hmc476-498 IC<sub>50</sub> / 24h = 24.22  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 48h = 25.63  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> / 72h = 22.13  $\mu$ M. In trypomastigotes the effect was evaluated at the time of 24 hours by counting in Neubauer chamber, where Hmc666-678, Hmc364-382 have inhibitory effect at almost all concentrations tested in a similar manner. It was estimated the selectivity index (IS), where the peptide Hmc364-382 has IS above 55.24, Hmc666-678 has IS above 45.35, Hmc476-498 has IS 1.99 and Hmc185-197 IS of 1.27. Based on the selectivity index the Hmc666-678, Hmc364-382 were selected for the later trials. Effect against amastigote forms was also found after 24 hours of incubation for both peptides at the IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> / 2 and 2xIC<sub>50</sub> concentrations and no reduction in the percentage of infected cells was observed. In the search for the mechanism of action of the selected peptides the ultrastructural changes were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) after 24 hours of incubation and transmission (TEM) after 12 incubation. Effects on plasma membrane integrity (7-aminoactinomycin D labeling), externalization of phosphatidylserine (AX labeling), reactive oxygen species (oxidized 2'-7'-dichlorofluorescein labeling) and mitochondrial transmembrane potential rhodamine 123) were evaluated by flow cytometry. The results of MET indicate autophagic signs, whereas SEM and cytometry indicate necrosis and late apoptosis. Suggesting an autophagic onset and progression to apoptosis and necrosis. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and analyzed using ANOVA with Bonferroni's post-test in the program GraphPad Prism 5. In conclusion, the four evaluated peptides showed anti-chagasic potential and Hmc666-678, Hmc364-382 present promising effect, with effect on all the evolutionary forms of *T. cruzi* and IS above 45 with involvement of necrosis, autophagy and apoptosis in its mechanism of action

**Keywords:** Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Hemocyanin; *Penaeus monodon*;

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição de Doença de Chagas no Mundo.....	21
<b>Figura 2</b>	Formas evolutivas do <i>T.cruzi</i> .....	23
<b>Figura 3</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
<b>Figura 4</b>	Diagrama ultraestrutural da forma epimastigota .....	27
<b>Figura 5</b>	Estrutura molecular do benzonidazol .....	29
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática do ensaio para determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre células LLC-MK2.....	46
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	47
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	48
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática do ensaio para avaliação do efeito dos peptídeos testados sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	49
<b>Figura 10</b>	Efeito citotóxico dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> sobre as células LLC-MK2.....	55
<b>Figura 11</b>	Efeito citotóxico de Hmc364-382 sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> .....	58
<b>Figura 12</b>	Efeito citotóxico de Hmc666-678 sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> .....	60
<b>Figura 13</b>	Efeito citotóxico de Hmc476-498 sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> .....	62
<b>Figura 14</b>	Efeito citotóxico de Hmc185-197 sobre a forma epimastigota de <i>T.cruzi</i> .....	64
<b>Figura 15</b>	Efeito citotóxico dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> sobre a forma tripomastigota de <i>T.cruzi</i> . .....	66

<b>Figura 16</b> Efeito citotóxico de Hmc364-382 e Hmc666-678 sobre a forma amastigota de <i>T.cruzi</i> .....	70
<b>Figura 17</b> Fotomicrografia das lamínas de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y submetidas ao ensaio de atividade anti-amastigota do peptídeo Hmc364-382 nas concentrações testadas.....	72
<b>Figura 18</b> Fotomicrografia das lamínas de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y submetidas ao ensaio de atividade anti-amastigota dos peptídeos e Hmc666-678 nas concentrações testadas.....	73
<b>Figura 19</b> Modificações ultra estruturais causadas pelo peptídeo Hmc666-678.	74
<b>Figura 20</b> Modificações ultra estruturais causadas pelo peptídeo Hmc364-382.	75
<b>Figura 21</b> Efeito dos peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382 na ultraestrutura de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão.....	76
<b>Figura 22</b> Perfil de morte em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 h de tratamento com Hmc666-678 e Hmc364-382.....	77
<b>Figura 23</b> Perfil de morte celular da forma epimastigotas no tempo de 24 horas induzida por Hmc666-678 e Hmc364-382.....	78
<b>Figura 24</b> Análise de espécies reativas de oxigênio em epimastigotas tratados com Hmc666-678 e Hmc364-382 por citometria de fluxo.....	79
<b>Figura 25</b> Histograma representativo do sinal fluorescente de DCF para Hmc666-678.....	80
<b>Figura 26</b> Histograma representativo do sinal fluorescente de DCF para Hmc364-382.....	90
<b>Figura 27</b> Fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com os peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382 marcadas com Laranja de Acridina.....	81
<b>Figura 28</b> Histograma representativo do sinal fluorescente de laranja de acridina do peptídeo Hmc 666-678.....	82

<b>Figura 29</b> Histograma representativo do sinal fluorescente de laranja de acridina do peptídeo Hmc364-382.....	82
<b>Figura 30</b> Análise do $\Delta\Psi_m$ de epimastigotas tratados com com os peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382.....	83
<b>Figura 31</b> Histograma de intensidade de marcação com Rho123 gerada pelo peptídeo Hmc666-679.....	84
<b>Figura 32</b> Histograma de intensidade de marcação com Rho123 gerada pelo peptídeo Hmc364-382.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Sequência de aminoácido da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> ...	42
<b>Tabela 2</b>	– Características dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> .....	43
<b>Tabela 3</b>	Características físico-químicas dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> .....	43
<b>Tabela 4</b>	– Viabilidade celular das células LLC-MK2 submetidas ao método do MTT após tratamento com os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678.....	56
<b>Tabela 5</b>	– Viabilidade celular das células LLC-MK2 submetidas ao método do MTT após tratamento com os peptídeos Hmc476-498 e Hmc185-197.....	57
<b>Tabela 6</b>	– Viabilidade celular das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com Hmc364-382.....	59
<b>Tabela 7</b>	– Viabilidade celular) das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com Hmc666-678.....	61
<b>Tabela 8</b>	– Viabilidade celular das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com Hmc476-498. ....	63
<b>Tabela 9</b>	- Viabilidade celular das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com Hmc185-197.....	65
<b>Tabela 10</b>	- Viabilidade celular das formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678.....	67
<b>Tabela 11</b>	Viabilidade celular das formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com os peptídeos Hmc476-498 e Hmc185-197.....	67

<b>Tabela 12</b> – Resumo da atividade biológica <i>in vitro</i> dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> sobre células LLC-MK2 e formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y.....	68
<b>Tabela 13</b> - Valores numéricos obtidos no ensaio de atividade anti-mastigota <i>in vitro</i> dos peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678.....	70
<b>Tabela 14</b> - Valores numéricos obtidos no ensaio de atividade anti-mastigota <i>in vitro</i> dos peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 em relação ao número de células não infectadas.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BZ</b>	Benzonidazol
<b>CT</b>	Controle
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNDi</b>	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
<b>EPM</b>	Erro Padrão Médio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>HMC</b>	Hemocianina
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de inibir 50%
<b>LIT</b>	Meio Liver infusion tryptose
<b>LLC-MK2</b>	Células epiteliais renais de macaco
<b>LPRDT</b>	Laboratório de Pesquisa Renal e Doenças Tropicais
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de Transmissão
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de Varredura
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAMs</b>	Peptídeos Antimicrobianos
<b>PBS</b>	Tampão fosfato em salina
<b>RPM</b>	Rotação Por Minuto
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>IS</b>	Índice de Seletividade
<b>μM</b>	Micromolar



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1	Doença de Chagas .....	20
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
1.3	Tratamento .....	27
1.4	Bioprospecção de moléculas bioativas .....	29
1.5	<i>Camarão Penaeus monodon</i> e Hemocianinas.....	31
1.6	Peptídeos Antimicrobianos e propriedades físico-químicas .....	32
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	39
3.1	Objetivo Geral .....	40
3.2	Objetivos Específicos .....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
4.1	Obtenção dos peptídeos .....	42
4.2	Cultivo e manutenção celular .....	43
4.2.1	LLC-MK2.....	43
4.2.2	Formas Epimastigotas .....	44
4.2.3	Formas Tripomastigotas .....	44
4.3	Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> (Ensaio de redução de MTT).....	44
4.4	Estudo in vitro da atividade antichagásica dos peptídeos derivados da hemocianina do <i>Penaeus monodon</i> .....	48
4.4.1	Ensaio em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	46
4.4.2	Ensaio em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	47
4.4.3	Ensaio em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	48
4.5	Avaliação do mecanismo de morte celular em cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	49
4.5.1	Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais.....	50
4.5.1.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	50
4.5.1.2	Análises ultraestruturais por Microscopia eletrônica de Transmissão....	50
4.5.2	Análise por citometria de fluxo.....	51
4.5.2.1	Efeito necrótico e/ou apoptótico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	51
4.5.2.2	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	51
4.5.2.3	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	52
4.5.2.4	Avaliação de indução de autofagia.....	52

4.7	Análise Estatística.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>95</b>

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

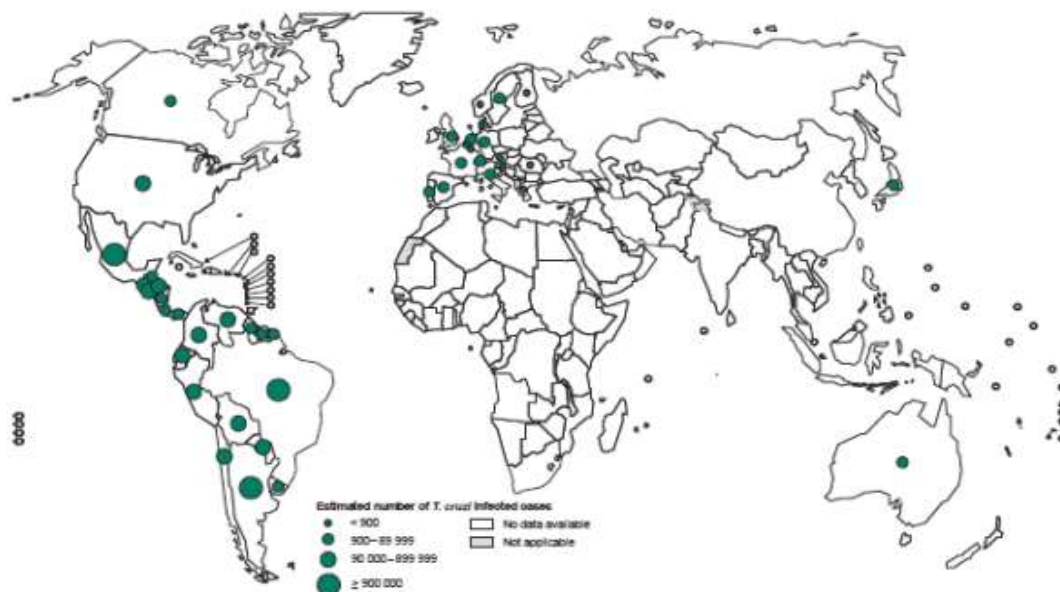
A doença de Chagas (DC) foi descrita em 1908 por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, pesquisador brasileiro, que posteriormente foi nomeado diretor do Instituto Oswaldo Cruz, de 1917 até sua morte (CHAGAS, 1909). Essa doença também é denominada como tripanossomíase americana, terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional, a Dndi (WHO, 2016).

A DC é uma doença infecciosa causada por um protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* e considerada uma antropozoonose, ou seja, uma doença que liga o homem ao animal, a mesma é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das dezessete principais doenças tropicais negligenciadas e considerada a doença parasitária responsável pelo maior índice de óbitos. O problema relacionado a esta patologia existe para o homem desde a antiguidade e continua a ser de relevância econômica e social em muitos países, principalmente nos pertencentes a América Latina, onde a doença é endêmica (RASSI, RASSI, MARIN-NETO, 2010; ÁLVAREZ *et al.*, 2014; COURA, 2015; WHO, 2016).

De acordo com estudos anteriores, existem no mundo cerca de 8 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões em risco de adquirir a doença. Embora, inicialmente, a DC estivesse restrita a América Latina, uma possível mobilidade da população levou ao aparecimento dessa patologia em regiões não endêmicas (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012; WHO, 2016).

A DC foi recentemente listada entre as doenças emergentes presentes na região sul dos Estados Unidos e nas últimas décadas foi encontrada em alguns países europeus, como observado na figura 1 (BEARD *et al.*, 2003; DIAZ; HISTORY; BURDEN, 2008; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; OMS, 2015; EDWARDS *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Distribuição de Doença de Chagas no Mundo.



Fonte: WHO, 2016.

No Brasil entre o período de 2007 a 2016, foram registrados casos confirmados da DC em diversas localidades. Cerca de 95%, concentra-se na região Norte, sendo o estado do Pará o responsável por 85% dos casos (WHO, 2016).

A DC apresenta três fases distintas: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda ocorre nas primeiras 4-6 semanas após a infecção, esta pode ser sintomática ou assintomática, iniciando-se com reação inflamatória local na região de entrada do parasito. Os sintomas mais comuns da fase aguda são febre e mal-estar, considerados eventos inespecíficos e que são comuns em outras patologias, por isso muitas vezes a fase aguda passa despercebida pelos portadores. Outros dados clínicos importantes na triagem de paciente com DC aguda incluem os sinais clássicos da picada por barbeiro, observados na figura 3 o chagoma de inoculação e o sinal de Romanã, (COSTA *et al.*, 2011). Porém em situações menos recorrentes podem aparecer como manifestações clínicas como a esplenomegalia, hepatomegalia, insuficiência cardíaca e meningoencefalite, observados na figura 3 (LANA, TAFURI, 2005; BILOLO, RIBEIRO, CLAUSELL, 2010).

Após este período, a maioria dos indivíduos encontram-se

assintomáticos, apresentando a forma indeterminada da infecção, descrita por Carlos Chagas em 1985, que se caracteriza por positividade sorológica para *T. cruzi* e estudos radiológicos e eletrocardiográficos aparentemente normais (RASSI, RASSI, MARCONDES DE REZENDE, 2012). Duas décadas após a infecção, onde a doença já se encontra na fase crônica, aproximadamente 30% dos pacientes infectados podem evoluir para a Cardiopatia Chagásica Crônica e em torno de 10% desenvolvem a forma digestiva da doença (AYO *et al.*, 2013; BESTETTI, RESTINI, 2014).

As imunidades inata e adquirida estão envolvidas no controle do crescimento de *T. cruzi*, no entanto, o parasito não é totalmente eliminado através da resposta imune, persistindo no hospedeiro. Com isso há continuidade da resposta imunológica, que pode resultar em lesões teciduais observadas nas manifestações clínicas da doença (LANA, TAFURI, 2005). Como relatado o infiltrado inflamatório pode ser responsável pelas lesões teciduais verificadas na DC crônica (CUNHA-NETO *et al.*, 2009; DUTRA *et al.*, 2009). Além disso, quimiocinas e seus receptores podem estar envolvidos na patogênese dessa doença (MACHADO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A DC é transmitida classicamente pelas fezes e urinas contaminadas com o parasito, essas são e liberadas após o repasto sanguíneo por seus insetos vetores, porém também pode ocorrer a transmissão por transfusão sanguínea, via congênita e pela ingestão de alimentos ou bebidas contendo as formas infectantes do parasito. Outros mecanismos, considerados menos frequentes, incluem acidentes de laboratório e transplante de órgãos (COURA, 2007; COURA, 2015).

No Brasil, os meios de transmissão mais frequentes são a vetorial e a infecção oral, principalmente pela ingestão de açaí e caldo de cana contaminados com *T. cruzi* (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014). Esta via de transmissão é geralmente associada com uma alta concentração parasitária, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa com altos índices de mortalidade (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011).

O diagnóstico da DC deve ser realizado de forma a unir evidências epidemiológicas em associação de provas laboratoriais e sinais clínicos, com o objetivo de aumentar o grau de predição e acurácia (COSTA *et al.*, 2011). São usados testes laboratoriais distintos para diagnóstico de pacientes na fase aguda

e crônica, de acordo com as normas vigentes no Brasil (COSTA *et al.*, 2017).

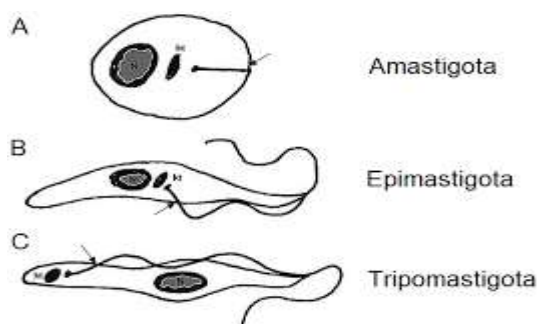
## 1.2 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário unicelular e parasito obrigatório. Possui um único flagelo e uma única mitocôndria alongada que termina em um cinetoplasto que contém o DNA mitocondrial. Este é classificado dentro da Ordem Kinetoplastida, da classe Zoomastigophorea, que se desenvolve em insetos hematófagos da família Reduviidae, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos (CHAGAS, 1909; RASSI; MARINETTO, 2010).

*T. cruzi* possui ciclo de vida complexo, classificado como heteroxênico, pois requer passagem obrigatória em dois hospedeiros, o inseto vetor triatomíneo, e um hospedeiro vertebrado. O parasito passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no inseto vetor (BONNEY; ENGMAN, 2010).

Durante seu ciclo de desenvolvimento, o parasito apresenta três principais formas evolutivas, morfológica e funcionalmente distintas: epimastigota (forma proliferativa não infectante, presente no intestino médio do inseto), tripomastigota (forma não proliferativa infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto) e amastigota (forma proliferativa intracelular). Figura 2 (ADADE *et al.*, 2013).

**Figura 2:** Formas evolutivas de *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de ROSSI *et al.* (2003).

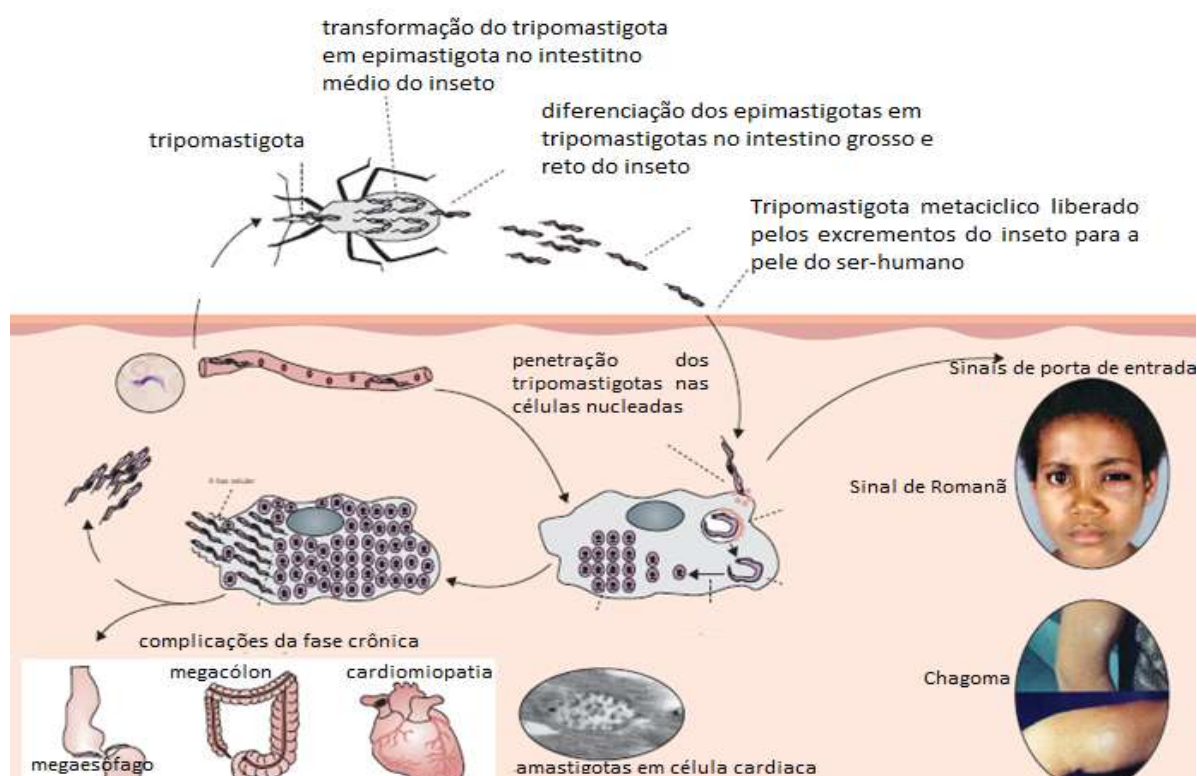
O inseto vetor triatomíneo se infecta ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado com as formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, as formas tripomastigotas migram para o estômago do inseto, onde a maioria é destruída por enzimas digestivas. Os parasitos remanescentes se transformam em formas epimastigotas, que por sua vez migram para o intestino médio do inseto e se multiplicam por divisão binária (CHATELAIN, 2017). Parte das epimastigotas migram para o intestino posterior onde se diferenciam nas formas tripomastigotas metacíclicas, as formas infectantes para várias espécies de mamíferos, inclusive o ser humano.

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre no momento do repasto sanguíneo o triatomíneo, quando o inseto deposita junto a região da picada excrementos contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas. Também ocorre a liberação de uma substância irritante que ocasiona prurido, levando a um incômodo e coceira local, o que leva os tripomastigotas metacíclicos são levados para o orifício da picada pelo próprio hospedeiro vertebrado, caracterizando o início do processo de infecção (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Após a infecção, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de sobreviver e reproduzir-se em uma variedade de células nucleadas (SILVA *et al.*, 2007). O tripomastigota metacíclico, se liga aos receptores de superfície celular no hospedeiro mamífero, onde o parasito é levado para um vacúolo parasitóforo. Isso ocorre, independentemente, da célula hospedeira ser ou não fagocítica (FRANCISCO *et al.*, 2017), onde se convertem em formas amastigotas; que por sua vez se proliferam no interior da célula por sucessivas divisões binárias e, após isso, ocorre a diferenciação em formas tripomastigotas que rompem a célula e caem na circulação sanguínea (LIMA *et al.*, 2010). Após a ruptura celular, as formas tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea podem infectar novas células e disseminar-se para outros órgãos ou serem ingeridas por outro inseto vetor, propagando o ciclo, representado na figura 3 (MUÑOZ-SARAIVA *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: adaptada de Rassi Jr. A *et al.*, 2010.

Morfologicamente a membrana plasmática de *T. cruzi*, pode ser observada na figura 4, é constituída por dupla camada lipídica associada com diferentes proteínas, além de constituintes que estão em contato com o meio extracelular formando o glicocálice. As proteínas tais como, mucinas, transialidase e a família Tc85, estão distribuídas ao longo da barreira bilipídica (SOUZA, 2009). A camada glicocálice é constituída por glicolipídios, glicoproteínas e lipopeptídios sendo que nas formas tripomastigotas é cerca de três vezes mais espessa que em epimastigota (MARTINS *et al.*, 2012).

O flagelo é uma estrutura que está presente nas três formas evolutivas, porém de maneira diferenciada. Sua principal função é proporcionar mobilidade ao parasito sendo também alvo de alguns grupos de drogas tripanocidas. São formados por 9 pares de microtúbulos periféricos, um par central e emergem de uma invaginação da membrana plasmática, a bolsa flagelar. Em epimastigotas e tripomastigotas o flagelo está aderido em uma estrutura na membrana denominada zona de adesão e em todas as formas está

associado ao corpúsculo basal e ao cinetoplasto, observado na figura 4 (SOUZA 2009).

A família *Tripanosomatidae* é caracterizada por possuir apenas uma mitocôndria, que está ramificada ao longo do corpo do parasito, apresentando cristas e parede irregular. Está presente em todos os estágios evolutivos, podendo variar na organização estrutural e na composição molecular (ADADE e SOUTO-PADRÓN, 2010; MARTINS *et al.*, 2012). A mitocôndria de *T. cruzi* está relacionada com uma estrutura de redes de DNA mitocondrial (kDNA), denominada de cinetoplasto, que representa 30% do DNA total da célula. Está localizado próximo ao núcleo, mas sua forma e estrutura variam com o estágio de desenvolvimento do parasito (SOUZA, 2009). Nas formas epimastigotas e amastigotas se apresentam em forma de bastão, enquanto que nas tripomastigotas o kDNA se organiza em filamentos, observados na figura 4 (ADADE E SOUTO-PADRÓN, 2010).

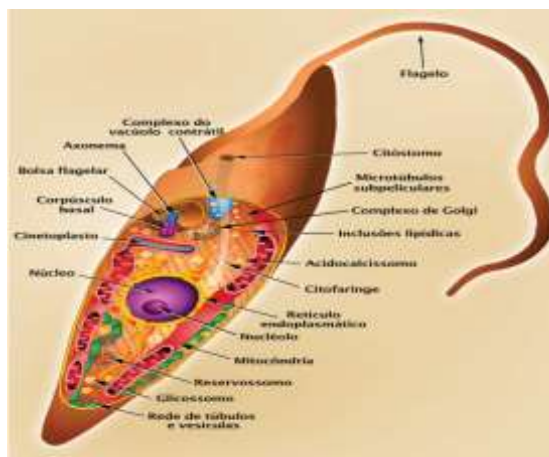
Os reservossomos são estruturas concentradas na região posterior das formas epimastigotas e perdidas durante a transformação em tripomastigota (MARTINS *et al.*, 2012). Acumulam proteínas e lipídios oriundos da endocitose, dessa forma sua principal função é armazenar e degradar moléculas. As formas tripomastigotas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

Os glicosossomos são organelas de formas esféricas ou alongadas com matriz homogênea e envolvidas por uma membrana. A maioria dos mecanismos glicolídicos ocorre nos glicosossomos, sendo considerado um tipo especial de peroxissomos devido à presença de catalase (DE SOUZA, 2009; ADADE E SOUTO-PADRÓN, 2010). Os acidocalcisomas são organelas vacuolares ácidas, capazes de transportar cálcio e prótons no parasito. Suas principais funções são: regulação de pH; armazenamento de cálcio, magnésio, fósforo e regulação osmótica (DE SOUZA, 2009).

O núcleo do *T. cruzi* apresenta uma típica membrana com poros e cromatina condensada. A membrana nuclear permanece intacta durante todo o processo de divisão, entretanto, ocorre desorganização interna com aparecimento de microtúbulos, dispersão da cromatina e desaparecimento do nucléolo (DE SOUZA, 2009). Os estudos ultraestruturais do núcleo podem

indicar o mecanismo de morte do parasito na presença de diferenças drogas (ADADE E SOUNTO-PÁDRON, 2010).

**Figura 4.** Diagrama ultraestrutural da forma epimastigota.



Fonte: FioCruz 2017.

### 1.3 Tratamento

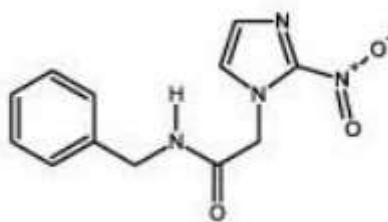
O tratamento da DC ainda é limitado a duas drogas existentes há mais de 40 anos: nifurtimox produzido em 1967 e benzonidazol, introduzido na terapêutica em 1972, ambos medicamentos sugerem um mecanismo de ação envolvendo a redução de grupos nitro através da nitroreductase, gerando espécies citotóxicas que danificam DNA, lipídeos e proteínas, com o intuito de combater o parasito (DOCAMPO e MORENO, 1986; CLAYTON, 2010). O nifurtimox, primeiro a ser indicado para o tratamento da forma aguda da Dc, foi lançado pelo Laboratório Bayer com o nome comercial de Lampit®, enquanto o benzonidazol, composto nitroheterocíclico (N-benzil-2nitro-1-imidazolacetaminda) (Figura 5) foi produzido, inicialmente, pelo Laboratório Roche com o nome comercial de Rochagan®, e teve sua patente transferida para o Brasil em 2003, passando a ser produzido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) (OLIVEIRA *et al.*, 2008). No Brasil, o nifurtimox foi proibido de ser comercializado em nosso país, por conta de sua elevada toxicidade (LANA, TAFURI, 2005).

O benzonidazol deve ser preferencialmente administrado na fase

aguda, pois é nesta fase que apresenta maior eficácia na cura da infecção. O Ministério da Saúde recomenda o uso do benzonidazol na fase crônica da DC para apenas um grupo restrito de pacientes, como por exemplo os jovens, já que este medicamento não consegue eliminar totalmente o parasito e desencadeia muitos efeitos adversos (PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011). A terapia em longo prazo pode ser altamente tóxica ao organismo (ANDRADE *et al.*, 2011).

Entre os efeitos adversos comumente observados em pacientes que utilizam este medicamento estão as reações cutâneas, febre, dermatite atópica, eritematose, erupções sensíveis à luz, púrpura, perda de peso e distúrbios gastrointestinais, logo nas primeiras semanas de tratamento. O avançar do tratamento pode culminar em leucopenia, trombocitopenia e distúrbios neurológicos como degeneração neuronal e desmielinização (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; VIOTTI *et al.*, 2009). A necessidade do emprego deste medicamento em esquemas posológicos prolongados, de pelo menos dois meses, com doses diárias de 5-7 mg/kg de peso corporal, facilita o surgimento dessas reações (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012).

**FIGURA 5.** Estrutura molecular do benzonidazol



Fonte: NOGUEIRA *et al.*, (2011).

Assim, o principal recurso disponível para indivíduos em fase crônica normalmente não abrange o combate ao parasito nem à doença: consiste meramente em amenizar os sintomas para que o portador de Chagas tenha uma melhor qualidade de vida e uma maior expectativa de vida. (RIBEIRO *et al.*, 2012). No entanto, é importante destacar que a fase crônica é a apresentação clínica mais comum desta enfermidade (CLAYTON, 2010a,

2010b).

O mecanismo de ação do benzonidazol ainda não foi totalmente elucidado. Alguns estudos sugerem que benzonidazol atua como um pró-fármaco sendo ativado por nitroredutases mitocondriais parasitárias, que reduzem o benzonidazol gerando metabólito tóxico sem significativa geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WILLKINSON *et al.*, 2011). No entanto, o possível mecanismo mais relatado na literatura sugere que o efeito tripanocida do nitrocomposto deve-se a redução dos grupamentos nitro, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio) e metabólitos eletrofílicos, os quais podem fazer ligações covalentes com macromoléculas vitais do parasito e promover dano oxidativo ao *T. cruzi* (MAYA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SESTICOSTA *et al.*, 2014; URBINA; DOCAMPO, 2005).

#### **1.4. Bioprospecção de moléculas bioativas**

Desde o início da humanidade, o ser humano busca na natureza recursos para aliviar a dor e tratar as doenças que o acomete. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se nos recursos advindos da natureza seja estes oriundos de plantas, animais ou minerais (BARBERATO FILHO, 2006).

Os produtos naturais fornecem uma fonte rica de novos medicamentos para tratar diversas doenças, como as negligenciadas (LI VEDERAS, 2009). As substâncias bioativas derivadas de produtos animais apresentam potencial aplicação em biotecnologia (SILVA *et al.*, 2014), pois possuem estruturas com grande diversidade e especificidade química, e outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novas drogas (LAHLOU, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

Os oceanos se tornam uma opção de busca, pois representam cerca de 70% do habitat terrestre, sendo responsáveis por um grande número de organismos com alta diversidade biológica e química. Embora a maioria das drogas ainda seja derivada de fontes terrestres, um número considerável de drogas, candidatos a medicamentos e outros metabólitos de organismos marinhos foram identificados nos últimos anos. Cerca de 30.000 compostos de

origem marinha são conhecidos e, desde 2008, mais de 1.000 compostos são descobertos a cada ano. Eles são frequentemente caracterizados pela novidade estrutural, complexidade e diversidade ( KIURU *et al.* , 2014 ; HU *et al.* , 2015).

Com base em suas estruturas, os produtos naturais marinhos identificados pertencem a vários grupos químicos como os: policetídeos, terpenos, saponinas esteroidais ou triterpênicas, carboidratos, compostos alifáticos, aminoácidos, alcalóides, peptídeos, lipopeptídeos e proteínas. A maior proporção de compostos bioativos pertence ao grupo dos peptídeos ( HU *et al.*, 2015 ). A maioria destes compostos foi isolada de animais invertebrados marinhos. Assim o ambiente aquático atrai cada vez mais atenção para a descoberta de moléculas bioativas (JENSEN E FENICAL, 2000; SCHWEDER *et al.*, 2005; TARMAN *et al.*, 2013).

Previamente, foi descoberto que compostos anti-câncer representavam mais da metade dos novos produtos naturais marinhos descobertos de 1985 a 2012. Seguido por compostos com atividade antibacteriana (HU *et al.*, 2015), atividades antiinflamatórias (CHEUNG *et al.*, 2016), antifúngicas, antivirais (MAYER *et al.* , 2010 ).

O mercado global de produtos farmacêuticos de origem marinha é de cerca de US\$ 5 bilhões. No entanto, apesar de descobertas promissoras, como o fungo produtor de cefalosporina em 1948 na costa da Sardenha, poucos medicamentos derivados da biodiversidade marinha foram aprovados, embora os invertebrados marinhos tenham se mostrado boas fontes de compostos biologicamente ativos . Exemplos de medicamento incluem trabectedina (Yondelis® , uma droga antitumoral derivada do mar do Caribe), vidarabina (uma droga antiviral derivada de uma esponja marinha), citarabina (Ara-C, um agente antileucemia derivado de esponja) e ziconotida (um agente analgésico derivado de um peptídeo pertencente ao caramujo cônico) (SK, 2015). A biodiversidade marinha é, portanto, um importante recurso inexplorado, especialmente em países com alta biodiversidade endêmica (LINDEQUIST, 2016).

### 1.5 Camarão *Penaeus monodon* e Hemocianinas.

Conhecido como camarão-tigre-gigante, *Penaeus monodon* (FABRICIUS, 1798) é uma espécie de camarão peneídeo originária das águas costeiras da região Indo-Pacífica, que pode atingir um comprimento de 33 cm e a partir da década de 1970 passou a ser utilizado em cultivos no Brasil (COELHO *et al.*, 2001).

Para se defender de patógenos, os camarões utilizam sua imunidade natural. O sistema imune inato é baseado na ação dos componentes celulares (hemócitos) e humorais (34 moléculas ativas) do sistema circulatório, os quais interagem para detectar e eliminar microrganismos e parasitos estranhos (BACHERÈ, 2000).

A hemocianina (HMC) é a molécula nos artrópodes equivalente a hemoglobina humana. A HMC, principal componente da hemolinfa, é uma glicoproteína gigante extracelular contendo cobre e representa tipicamente até 95% da quantidade total de proteína. É incolor na forma desoxi e azul na forma oxigenada, cuja função tradicional é o transporte de oxigênio para o organismo (VAN HOLDE, MILLER, 1995). Foi demonstrado também que a hemocianina está envolvida em outros processos fisiológicos como armazenamento de energia, osmorregulação, ciclo de muda e formação de exoesqueleto (ADACHI *et al.*, 2005), além de possui atividade antimicrobiana, possivelmente por atuar como uma proteína multifuncional associada à defesa imunitária em invertebrados (PAUL E PIROW, 1998; COATES E NAIRN, 2014).

No curso de uma infecção, em algumas reações de defesa, várias moléculas tem sua expressão estimulada. Essas moléculas participam do reconhecimento de padrões moleculares, acionando mecanismos de defesa celulares e humorais ou mesmo a resposta antimicrobiana direta. Entre elas estão as lectinas e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; THEOPOLD *et al.*, 2004).

Componentes da resposta imune inata de invertebrados, como peptídeos antimicrobianos, atuam como primeira linha de defesa contra organismos patogênicos. Estes peptídeos foram selecionados no curso da evolução por sua capacidade de atacar bactérias, fungos, protozoários e vírus (TORRENT *et al.*, 2013, MARÓTI *et al.*, 2011; ZASLOFF, 2002). Os peptídeos antimicrobianos e

seus derivados sintéticos apresenta efeitos contra cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, e efeitos antiparasitários contra *T. cruzi*, trypanosomas africanos e *Leishmania* spp (LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2008; KULKARNI *et al.*, 2009a).

Estudos demonstram que em certos invertebrados, como aranhas, moluscos e camarões, os peptídeos antimicrobianos são sintetizados constitutivamente nos hemócitos e armazenados em seus grânulos (Bachere *et al.*, 2004). A atividade antimicrobiana de frações derivadas da hemocianina; a partir da hemolinfa dos moluscos *Rapana venosa* e *Helix aspersa* foi encontrada a subunidade  $\beta$ c-HaH com atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (DOLASHKA *et al.*, 2016). Derivado da Hmc da lagosta-vermelha (*Procambarus clarkii*) as proteínas recombinantes rPcHMC1-T e rPcHMC1-C mostraram forte atividade antimicrobiana contra *Vibrio parahaemolyticus* e *S. aureus* por inibição do crescimento bacteriano, fenoloxidase (PO) e testes de fagocitose (QIN *et al.*, 2018). A partir do hemocianina do *Haliothis rubra*, foi originada um composto marinho com atividade antiviral contra infecções pelo vírus herpes simplex 1 (HSV-1) (ZANJANI *et al.*, 2016).

Além disso, também já foi demonstrado que HMC do camarão *Litopenaeus vannamei* poderia reagir com IgG humana ou IgA como um antígeno (ZHANG, 2006), se ligam a oito bactérias como uma aglutinina, interagem com eritrócitos não homogêneos como uma hemolisina (ZHANG, 2009), e aumentam a resposta imune do camarão a imunostimulantes como uma proteína imuno-estimulante relacionada (QIAO, 2011). A atividade antifúngica foi encontrada em fragmentos peptídicos da hemolinfa do camarão *Penaeus* (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2001), além disso hemócitos das fases larvais do camarão do gênero *Penaeus vannamei* são coletados para produzir e armazenar penaedins, uma classe de peptídeos antimicrobianos (RAVICHANDRAN *et al.*, 2010).

## 1.6 Peptídeos Antimicrobianos e propriedades físico-químicas

Os peptídeos, em geral, são responsáveis por uma mínima imunogenicidade, excelente penetrabilidade nos tecidos, baixo custo de



produção e facilidade em modificações moleculares para melhorar sua atividade biológica e sua estabilidade *in vivo*. Assim, peptídeos antimicrobianos (PAMs) oriundos de animais podem ser potenciais candidatos para antiparasitários (SUN; HUANG, 2016; TORRENT *et al.*, 2012; YAVARI *et al.*, 2018).

PAMs são um grupo heterogêneo de proteínas de natureza pequena, catiônica e anfipática em sua grande maioria, sendo usados pelo sistema imune inato de animais, plantas e seres humanos, como componentes chave, atuando como primeira linha de defesa imediata contra organismos patogênicos. Estes peptídeos foram selecionados no curso da evolução por sua capacidade antimicrobiana (COLE; LEHRER, 2003; TORRENT *et al.*, 2013; ZASLOFF, 2002).

Nas últimas décadas diversos PAMs estão sendo estudados e evidenciados em relação a sua atividade antichagásica, como por exemplo podemos citar as catelicidinas, batroxidina (MELLO *et al.*, 2017) e crotalicidina (BANDEIRA *et al.*, 2017) e sDq-2561 e sDq-3348 que demonstraram alto índice de seletividade e efeito contra amastigotas de *T. cruzi* (LIMA *et al.*, 2018).

É possível encontrar peptídeos derivados de animais que foram utilizados como modelo para o desenvolvimento de novos medicamentos (HARVEY, 2014), como o captopril, utilizado em casos de hipertensão, exanatida, utilizado no tratamento de diabetes e o ziconotida, utilizado como anestésico.

Apesar do ambiente aquático ser mais extenso e diversificado do que o ambiente terrestre, ele ainda é menos conhecido e estudado. A partir de meados do século passado um conjunto com novas técnicas de purificação e identificação de moléculas, levaram a um grande avanço na bioprospecção aquática (KELECOM, 1997), assim como estudos com o camarão.

Apesar dos peptídeos antimicrobianos poderem apresentar uma grande diversidade estrutural, é possível agrupá-los em classes distintas de estruturas secundárias (JENSSEN *et al.*, 2006). As estruturas mais comumente observadas são as  $\alpha$ -hélices, formadas apenas quando o peptídeo entra em contato com a membrana, e as folhas- $\beta$  estabilizadas por ligações dissulfeto 2-4 e que ocasionalmente apresentam pequenas porções de estrutura  $\alpha$ -hélice (RESENDE *et al.*, 2008), estas estruturas associadas às diferentes constituições

de aminoácidos auxiliam a determinar os mecanismos de interação com as células-alvo (WANG *et al.*, 2015).

Os peptídeos antimicrobianos possuem como mecanismo de ação mais comum a alteração de permeabilidade da membrana celular, mas também podem atuar inibindo a síntese da parede ou a atividade enzimática de microrganismos patogênicos (GUILHELMELLI *et al.*, 2016). Diferenças de estruturas/mecanismo alvo permitem que os PAMs possam ser agrupados em duas famílias de acordo com os principais mecanismos de atuação (WANG, 2013). O primeiro grupo corresponde às moléculas que atuam sobre a membrana citoplasmática, induzindo a sua permeabilização e, conseqüentemente a interrupção de seu normal funcionamento. O mecanismo de inibição ou morte celular pode ser explicado pela formação de poros na membrana, que no extremo, levam à sua ruptura (SATO e FEIX, 2006; LEE *et al.*, 2016). O segundo grupo corresponde a compostos cujos alvos de atuação são essencialmente intracelulares, principalmente sobre os ácidos nucleicos (WANG, 2013).

Vários autores propõem que as atividades antimicrobianas não dependem apenas de sequências específicas ou estruturas secundárias (MOWERY, 2007), mas da composição em um modo geral que determina exclusivamente as propriedades físico-químicas desses peptídeos e, por sua vez, a atividade biológica dessas moléculas (FINDLAY, 2010). De fato, muitas dessas propriedades são intrínsecas e exclusivas para cada resíduo de aminoácido e mudanças sutis levam a diferenças relevantes em funções biológicas da molécula, como a habilidade de inibir o crescimento de microrganismos ou sua citotoxicidade.

Um exemplo clássico disso é o trabalho realizado por Eisenberg *et al.* (1982), que criou uma ferramenta físico-matemática nomeada "momento hidrofóbico" ( $\mu H$ ) muito útil para caracterizar sequências de peptídeos e proteínas. Este parâmetro, juntamente com a hidrofobicidade ( $H$ ) e a carga líquida ( $z$ ) de peptídeos, tem sido amplamente utilizado em estudos de análise racional de interações peptídeo-membrana (DRIN; ANTONNY, 2010).

O momento hidrofóbico ( $\mu H$ ), medida quantitativa direta de anfipaticidade, é calculada por meio da soma dos vetores individuais da hidrofobicidade de cada aminoácido presente na sequência de um peptídeo (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS,

2012). As mudanças na hidrofobicidade de uma sequência estão intimamente relacionadas com sua capacidade de permear membranas eletricamente neutras. De acordo com Wieprecht *et al.* (1997), um aumento de  $\mu\text{H}$  de um peptídeo, mantendo todos os outros parâmetros físico-químicos constantes, potencializa consideravelmente sua permeabilização em vesículas constituídas lipídicas, o que é atribuído a um aumento da afinidade do peptídeo com a membrana. A maioria dos PAMs possuem regiões polares e apolares, resultantes da segregação de resíduos, assim podem-se ligar a constituintes hidrofóbicos e hidrofílicos das membranas dos microorganismos (MALANOVIC *et al.*, 2016) induzindo alterações na sua estrutura e integridade (BECHINGER, 2015).

Resíduos de aminoácidos são classificados de acordo com os grupos funcionais de sua cadeia lateral como, hidrofóbicos, hidrofílicos carregados e não-carregados. Essa classificação é originária de escalas de hidrofobicidades, nas quais ensaios experimentais ou simulações computacionais são utilizadas para classificar quantitativamente a hidrofobicidade de aminoácidos em determinados meios (WHITE, 2007).

Em vista que a DC atualmente não possui um tratamento ideal, novas moléculas de origem animal podem ser utilizadas como modelos na descoberta de medicamentos promissores.

# **Justificativa**

---

## 2.JUSTIFICATIVA

A DC é classificada como uma doença negligenciada, sendo esta a principal doença parasitária responsável por morbidade e mortalidade mundial, principalmente na população da América Latina e da América do Sul (DIAS, 2002; BARRETO, 2011; NÓBREGA, 2014). Ainda existem várias lacunas no conhecimento de pontos cruciais na doença de Chagas: o ciclo de vida de *T. cruzi* nos hospedeiros humanos, a ecologia do ciclo silvestre, os mecanismos de ação de drogas contra o parasito e a acessibilidade dos pacientes aos sistemas de saúde. O financiamento para a DC em 2012 foi de 31,7 milhões de dólares, o que representa cerca de 1% do financiamento total em P&D gasto com doenças negligenciadas globalmente (PESQUISA G-FINDER, 2013). Além disso, a pesquisa de novas e melhores drogas foi retardada ou esquecida durante anos até muito recentemente (VIOTTI *et al.*, 2014).

No Brasil, o único medicamento disponível é o benzonidazol, porém a sua eficácia ocorre logo após a infecção, ou seja, na fase aguda, possuindo uma taxa média de cura entre casos agudos e recentes de 80%, entretanto, inferior a 20% nos crônicos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SESTI-COSTA *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento causa diversos efeitos colaterais, não possui uma ação eficiente em cepas resistentes, além de contraindicado para indivíduos com insuficiência renal, hepática ou mulheres grávidas (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A OMS define como requisitos para um bom quimioterápico: (a) cura parasitológica dos casos agudos e crônicos da infecção; (b) efetividade em uma dose simples ou em poucas doses; (c) acessibilidade ao paciente, baixo custo e fácil obtenção; (d) sem efeitos colaterais ou efeitos teratogênicos; (e) não ter a necessidade de internação para o tratamento e (f) ausência de resistência do agente etiológico (COURA; DE CASTRO, 2002). O benzonidazol não atende a todos os critérios, de forma que se faz necessário a pesquisa por novas alternativas terapêuticas. Assim, existe uma real necessidade de se desenvolver uma forma mais eficaz de terapia contra a DC com o mínimo de efeitos colaterais possíveis (CHATELAIN, 2017).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso

patrimônio, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (PANDEY, 1998; CRAGG, 1997).

A bioprospecção marinha envolve a utilização racional do potencial biotecnológico da biodiversidade dos oceanos. Os oceanos ocupam mais de 70% da superfície do planeta e oferecem cerca de 300 vezes mais espaço habitável do que o ambiente terrestre (PINTO *et al.*, 2002; TEIXEIRA, 2010; MARTINS *et al.*, 2014). Muitos peptídeos antimicrobianos foram descritos em diversos grupos de seres vivos, dentre eles moluscos, insetos, crustáceos, plantas, anfíbios, peixes e mamíferos, com potencial antiprotozoário (LI *et al.*, 2012; YEUNG; GELLATLY; HANCOCK, 2011). Assim os PAMs derivados de animais aquáticos merecem especial atenção devido às inúmeras possibilidades de suas aplicações e como fonte alternativa contra agentes infecciosos multi-resistentes (JINDAL *et al.*, 2015) mas também por possibilitarem que os seus farmacóforos sejam a base para a descoberta de novas moléculas antimicrobianas (RAPSCH *et al.*, 2014; JINDAL *et al.*, 2015).

# Objetivos

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antichagásica *in vitro* dos fragmentos peptídicos com potencial antimicrobiano derivados da hemocianina do camarão *Penaeus monodon*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade dos peptídeos derivados da hemocianina do *P. monodon* em relação as células de mamíferos LLC-MK2.
- Determinar o efeito antiparasitário dos peptídeos estudados sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.
- Calcular o índice de seletividade dos peptídeos estudados em relação ao *Trypanosoma cruzi*
- Determinar a atividade dos peptídeos promissores sobre as formas amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*
- Investigar o mecanismo de ação dos peptídeos promissores sobre a forma epimastigota de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



# **Materiais e Métodos**

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos peptídeos

A estrutura da hemocianina do *P. monodon* foi obtida a partir do banco de dados Protein data bank (PDB) e submetida ao software de computacional AMPA, um programa de algoritmos que identificou quais os fragmentos que possuíam potencial antimicrobiano por meio da similaridade da sequência de aminoácidos presentes e características físico-químicas de peptídeos antimicrobianos já descrito na literatura. Os peptídeos foram desenhados, preparados e caracterizados (Tabelas 1, 2 e 3) pelo grupo do Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista, do Lab. Bioq & Biotec/Labomar/UFC, os quais foram gentilmente cedidos para serem usados no desenvolvimento desse trabalho de dissertação.

**Tabela 1** Sequência de aminoácido da hemocianina do *Penaeus monodon*.

<b>Sequência da hemociana de <i>Penaeus monodon</i></b>
MGTVMKVLFFFALVAAAAWPNFGFQSDAGGAADAQKQHDVNFLHKKIYGDIRD NLKKGKADSFDPKANLSHYSDDGGKAVQKLMRDLKDNRLQQRHWFSLFNPRQREEA LMLFDVLIHCKDWDTFVSNAAYFRQIMNEGEFVYALYVAVIHSPLSEHVLPPLYEVTP HLFTNSEVIEAAY <b>AKQTQKPGKFKSS</b> SFTGTCKNPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWH MEFPFWDDKYSHHLDRKGENFFVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVDELHWEKPIV QGFAPHTTYKYGGQFSPRPDNDVDFEDVDGVARIRDLLIVESRIRDAIAHGYIVDRAGN HIDIMNERGIDVLGDVIESSLYSP <b>NVQYYGALHNTAHIVLGRQ</b> SDPHGKYDLPPGVLE HFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDSLPPYTVEELTFAGVSVDNVAIEGELETFED FEYNLINAVDDTEQIPDVE <b>ISTYVRLNKHDFKIKIDVSN</b> KGQEVLATVRIFAWPHLDN NGIEFTFDEGRWNAIELDKFWVKLPAGTHHFERKSSAVTVPDFNHYGSHGKYPDN RPHGYPLDRKVPDERVFEDLPN <b>FGHIQVKVFNHGEYIQHD</b>

Legenda: Sequências de aminoácidos presentes na hemocianina do camarão do *Penaeus monodon* e em negrito as sequências selecionadas com potencial antimicrobiano pelo AMPA.

Fonte: A tabela foi elaborada e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista e Dr. Jean-Etienne Morlighem (Tabela 1), Lab Bioq & Biotecnologia, Labomar/UFC.

**Tabela 2** Características dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodons*

Nome do peptídeo	Tamanho	Estrutura primária dos peptídeos	MM	Estrutura secundária
Hmc185-197 <sup>(a)</sup>	13 <sup>(b)</sup>	AKQTQKPGKFKSS <sup>(c)</sup>	1433,69 <sup>(d)</sup>	$\alpha$ -hélice / folha- $\beta$ <sup>(e)</sup>
Hmc364-382 <sup>(a)</sup>	19 <sup>(b)</sup>	NVQYYGALHNTAHIVLGRQ <sup>(c)</sup>	2154,43 <sup>(d)</sup>	$\alpha$ -hélice / $\alpha$ -hélice / folha- $\beta$ <sup>(e)</sup>
Hmc476-498 <sup>(a)</sup>	23 <sup>(b)</sup>	ISTYVPRLNHKDFKIKIDVSNNK <sup>(c)</sup>	2730,19 <sup>(d)</sup>	folha- $\beta$ <sup>(e)</sup>
Hmc666-678 <sup>(a)</sup>	13 <sup>(b)</sup>	FGHIQVKVFNHGE <sup>(c)</sup>	1510,73 <sup>(d)</sup>	folha- $\beta$ <sup>(e)</sup>

Legenda: Nomenclatura dos peptídeos (a) Tamanho da sequência de aminoácidos (b) Estrutura primária dos peptídeos (c) Massa Molar (d) Estrutura secundária (e). AMPA result highlighted (threshold 0,225) & cyan (0, 25), Best results for potential antimicrobial peptides (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>).

Fonte: A tabela foi elaborada e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gandhi Rádís-Baptista e Dr. Jean-Etienne Morlighem (Tabela 1), Lab Bioq & Biotecnologia, Labomar/UFC.

**Tabela 3** Características físico-químicas dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodons*.

Nome do peptídeo	pI*	Carga líquida (z)	Hidrofobicidade	Momento hidrofóbico ( $\mu$ H)
Hmc185-197 <sup>(a)</sup>	- <sup>(b)</sup>	4 <sup>(c)</sup>	-0.108 <sup>(d)</sup>	0.215 <sup>(e)</sup>
Hmc364-382 <sup>(a)</sup>	10.5 <sup>(b)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	0.424 <sup>(d)</sup>	0.179 <sup>(e)</sup>
Hmc476-498 <sup>(a)</sup>	10.7 <sup>(b)</sup>	3 <sup>(c)</sup>	0.218 <sup>(d)</sup>	0.176 <sup>(e)</sup>
Hmc666-678 <sup>(a)</sup>	9.37 <sup>(b)</sup>	0 <sup>(c)</sup>	0.433 <sup>(d)</sup>	0.338 <sup>(e)</sup>

Legenda: Nomenclatura dos peptídeos (a) Tamanho da sequência de aminoácidos (b) Carga líquida em pH e pI neutro (c) Carga líquida (d) Hidrofobicidade (e) Momento hidrofóbico. \*<http://www.pep-calc.com/> AMPA result highlighted (threshold 0,225) & cyan (0, 25), Best results for potential antimicrobial peptides (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>).

Fonte: A tabela foi elaborada e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gandhi Rádís-Baptista e Dr. Jean-Etienne Morlighem (Tabela 1), Lab Bioq & Biotecnologia, Labomar/UFC.

## 4.2 Cultivo e manutenção celular

### 4.2.1 LLC-MK2

As células epiteliais de rim de macaco LLC-MK2 foram doadas pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, e foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> em meio

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) composto de glutamina (0,58 g/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (0,11 g/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, acrescido de penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal (SBF). A linhagem foi mantida em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, sendo observada diariamente em microscópio óptico invertido, até atingirem confluência (CECILIO *et al.*, 2013). A manutenção celular foi feita por meio de repiques, procedimento em que as células são removidas da superfície da garrafa, têm sua viabilidade avaliada por quantificação em câmara de Neubauer na presença de azul de trypan e são então transferidas para uma nova garrafa.

#### **4.2.2 Formas Epimastigotas**

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT composto de cloreto de sódio (4 g/L), cloreto de potássio (0,4 g/L), fosfato de sódio anidro (8 g/L), triptose (5 g/L), infusão de fígado (5 g/L), glicose (4 g/L), hemina (25 mg/L), suplementado com 10% SBF, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em garrafas plásticas estéreis e mantidas em incubadora a 28°C (RODRIGUES *et al.*, 2014). Para a sua manutenção foram realizados repiques semanais nas concentrações de 1:20 e de 1:200.

#### **4.2.3 Formas Tripomastigotas**

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir da infecção de cultura LLC-MK2 cultivadas em meio DMEM, enriquecido com 2% de SBF. Foi realizado a continuidade do ciclo parasitário por meio de infecções semanais nas células LLC-MK2.

### **4.3 Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon* (Ensaio de redução do MTT)**

A toxicidade celular dos peptídeos estudados em relação as células LLC-MK2, foi avaliada, estas células foram utilizadas durante os experimentos como hospedeiras de *T. cruzi*. Com a citotoxicidade estabelecida, foi possível escolher a partir de qual concentração os peptídeos seriam testados e

estabelecer o índice de seletividade, que tem por finalidade demonstrar a proporção de dano causado às células hospedeiras em relação aos danos causados por *T. cruzi* (NWAKA; HUDSON, 2006).

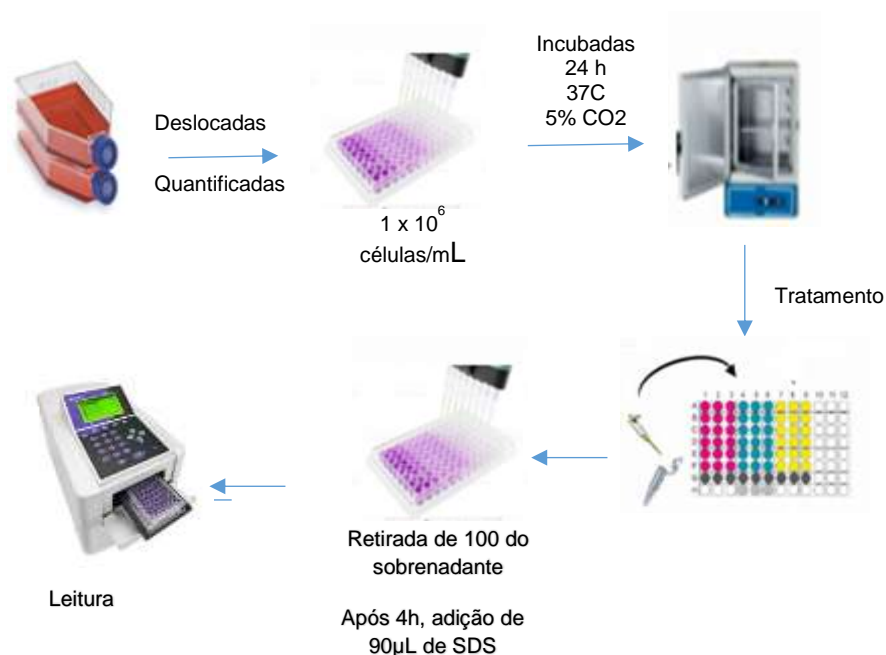
A citotoxicidade dos peptídeos em estudo sobre células LLC-MK2 foi determinada por meio do teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) - 2,5difeniltetrazólio (MTT), ensaio amplamente utilizado na quantificação espectrofotométrica da viabilidade celular (MOSMANN, 1983). (Figura 6).

O teste se baseia em uma reação colorimétrica de conversão do MTT em sal de formazan. O MTT, sal de cor amarelada, é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Esses cristais são solubilizados por um agente surfactante adicionado em seguida, e os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. A intensidade da cor violácea produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MENEZES, 2013; UNCITI-BROCETA *et al.*, 2015).

As células foram cultivadas em placas estéreis de 96 poços na concentração de  $10^5$  células/mL em meio DMEM a 10% de SBF, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/L) a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, foram tratadas com os peptídeos derivados da hemocianina do *P. monodon* nas concentrações 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µM e incubadas a 37°C durante 24 horas. MTT (2,5 mg/ml em PBS) foi adicionado a cada poço e as placas foram deixadas em repouso por 4 h a 37°C. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em 10% de dodecilsulfato de sódio (SDS) em 0,01 N de HCl. Após 17 h, e a leitura da absorvância foi realizada a 570 nm num leitor de microplacas (Biochrom® ASYS Expert Plus). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle de células não tratadas. A IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear.

**Figura 6:** Representação esquemática do ensaio para determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre células hospedeiras LLC-MK2.



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4 Estudo *in vitro* da atividade antichagásica dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon*.

A fim de investigar a atividade antiparasitária dos peptídeos estudados, foram realizados ensaios experimentais em relação as três principais formas do ciclo de vida de *T. cruzi*: epimastigotas, tripomastigotas e amastigota.

##### 4.4.1 Ensaio em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

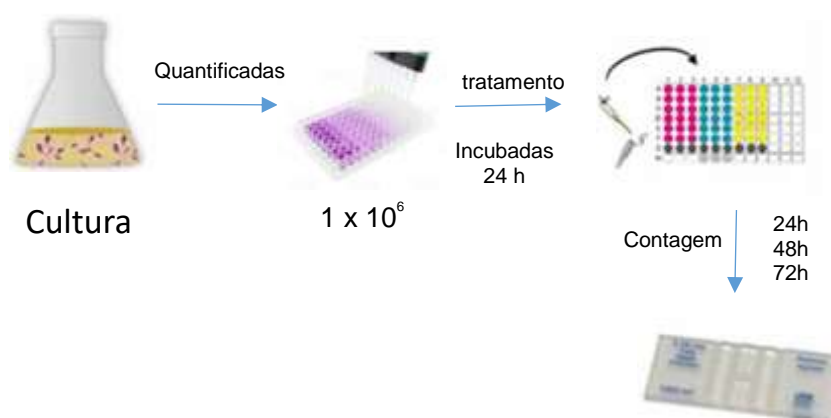
Para avaliação do efeito anti-proliferativo dos peptídeos Hmc185-197, Hmc364-382, Hmc476-498, Hmc666-678 nestas formas evolutivas, foram utilizados parasitos provenientes da fase exponencial da cultura inicial.

Formas epimastigotas (1 x 10<sup>6</sup> células/mL) na fase log de crescimento (ADADE *et al.*, 2014), foram plaqueadas e incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações dos peptídeos estudados (0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µM). Após os tempos de 24, 48 e 72 horas,

foram realizadas as quantificações de células viáveis em câmara de Neubauer (RODRIGUES *et al.*, 2014). Células tratadas com PBS estéril foram consideradas como controle negativo.

O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle negativo. A  $IC_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (Figura 7).

**Figura 7-** Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora.

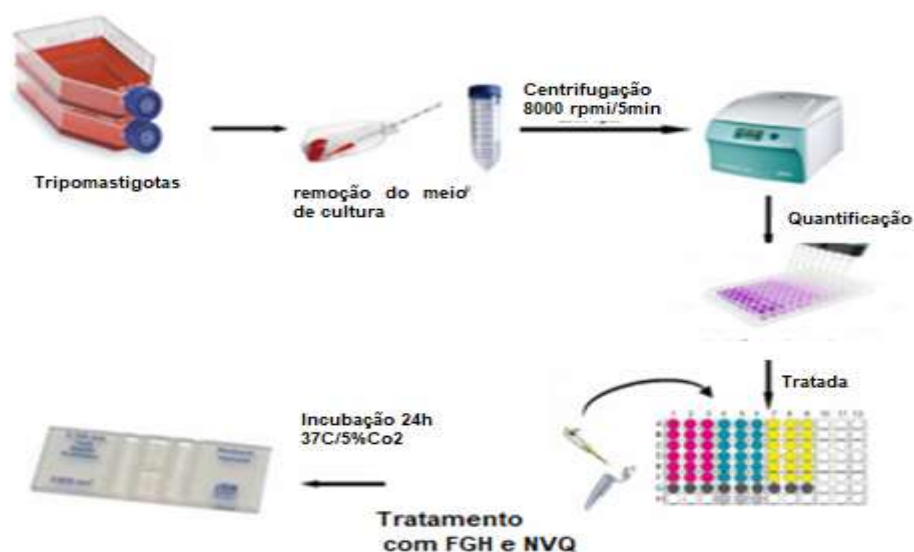
#### 4.4.2 Ensaio em formas tripomastigotas de *T. cruzi*,

Após 5 a 8 dias de infecção com *T. cruzi* nas células LLC-MK-2, o sobrenadante contendo as formas tripomastigotas que eclodiram, os parasitos foram centrifugados e ressuspensos na concentração de  $10^6$  células/mL. Posteriormente, os tripomastigotas foram incubados em placas de 96 poços estéreis e tratados com diferentes concentrações dos peptídeos Hmc185-197, Hmc364-382, Hmc476-498, Hmc666-678 (25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,19  $\mu$ M). Neste ensaio foi considerado como controle negativo células tratadas com PBS estéril (pH 7.4) (MEIRA *et al.*, 2015).

A viabilidade foi determinada após 24h de incubação em ambiente com 5%  $CO_2$  e temperatura de  $37^\circ C$  por quantificação em câmara de Neubauer.

O percentual de viabilidade celular foi calculado em comparação com o grupo controle negativo. A IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (Figura 8).

**Figura 8-** Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos peptídeos estudados sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4.3 Ensaio em formas amastigotas de *T. cruzi*.

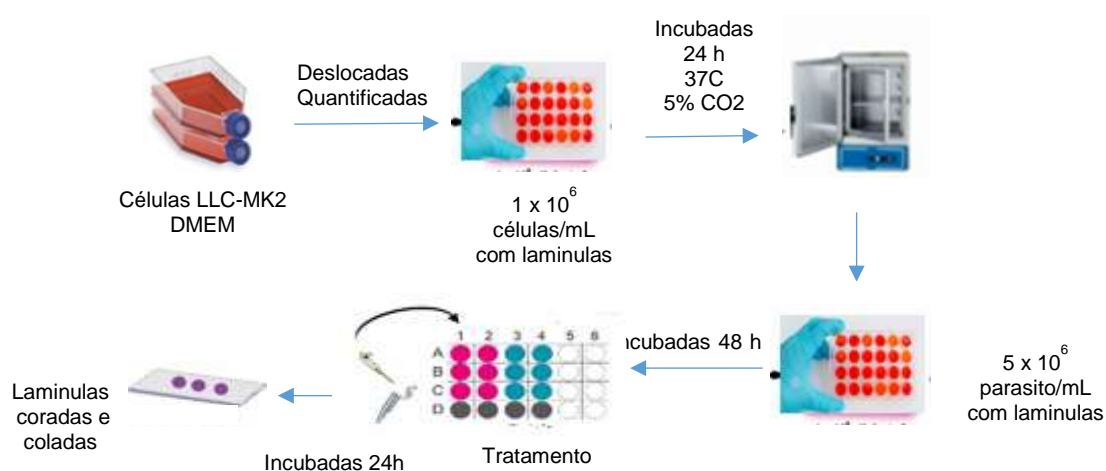
Para avaliar o efeito dos peptídeos mais promissores (Hmc666-678, Hmc364-382) em relação a forma amastigota, células LLC-MK2 foram incubadas ( $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ ) em placas estéreis com 24 poços contendo lamínulas circulares também estéreis em meio DMEM e suplementação de SBF 10% em temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as culturas com células aderidas foram infectadas com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 20:1 e mantidas sob mesmas condições em meio DMEM sem anfotericina e com suplementação de 2% de SBF.

Para que houvesse internalização dos parasitos e transformação em formas amastigotas intracelulares, aguardou-se um tempo de 48h. O



sobrenadante foi desprezado e as culturas foram então tratadas com peptídeos estudados nas concentrações de  $1,81\mu\text{M}$ ,  $3,62\mu\text{M}$  e  $7,24\mu\text{M}$  para Hmc364-382 caracterizando respectivamente a  $\text{IC}_{50/2}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $2\text{xIC}_{50}$  das formas tripomastigotas e nas concentrações de  $2,20\mu\text{M}$ ,  $4,41\mu\text{M}$  e  $8,82\mu\text{M}$  para Hmc666-678 caracterizando respectivamente a  $\text{IC}_{50/2}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $2\text{xIC}_{50}$  das formas tripomastigotas. O PBS foi utilizado como tratamento do controle negativo. Em seguida, as placas foram incubadas por períodos de 24h. Após estes períodos, as lamínulas foram lavadas fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa para posterior montagem em lâminas (ADADE *et al.*, 2014). Para determinar o número de amastigotas/100 células e o percentual de células infectadas foi realizado contagem em microscópio óptico de um total de 300 células em cada lamínula por experimento. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata (BANDEIRA *et al.*, 2017). (Figura 9).

**Figura 9** - Representação esquemática do ensaio para avaliação do efeito dos peptídeos testados sobre formas amastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.5 Avaliação do mecanismo de morte celular em cepa Y de *T. cruzi*.

A fim de investigar o mecanismo de morte induzido pelos fragmentos peptídicos mais promissores derivados da hemocianina em *T. cruzi*, foram

realizados ensaios em formas epimastigotas através de citometria de fluxo, microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

#### **4.5.1 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais**

##### **4.5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura**

Alterações na superfície dos parasitos causadas pelos peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382 foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente.

As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram tratadas nas concentrações de 2,00  $\mu\text{M}$ , 4,01  $\mu\text{M}$  e 8,02  $\mu\text{M}$  para o peptídeo Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39 $\mu\text{M}$ , 4,79 $\mu\text{M}$  e 9,58 $\mu\text{M}$  para Hmc364-382 caracterizando respectivamente sua  $\text{IC}_{50/2}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $2 \times \text{IC}_{50}$  incubadas em placas de 24 poços por 24 horas em estufa de BOD a 28 °C. Após a incubação, os parasitos foram fixados por 2 horas com 2,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavados duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada centrifugando-se a 5000 rpm por 10 min. Em seguida, as amostras foram desidratadas e séries crescentes de etanol (30-100%), colocadas em lamínulas de vidro, fixadas a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ , cobertas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, USA) (MELLO *et al.*, 2017). As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0.

##### **4.5.1.2 Análises ultraestruturais por Microscopia eletrônica de Transmissão (MET).**

As formas evolutivas epimastigotas foram tratados por 12 horas nas concentrações de 4,01  $\mu\text{M}$  para o Hmc666-678 e de 4,79  $\mu\text{M}$  para Hmc364-382 caracterizando a sua  $\text{IC}_{50}$ . Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 5,500g e lavados 2 vezes em PBS. A fixação foi realizada através de uma

solução de 2,5% Glutaraldeído, 4% paraformaldeído em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 durante 60 min a 4 °C. Após três lavagens no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas no escuro por uma hora em uma solução contendo 1% OsO<sub>4</sub>/0,8% ferricianeto de potássio/5 mM CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato 0,1M. As células foram desidratadas em gradientes crescentes de acetona e incluídas em resina Polybed 812 (PolySciences, Warrington, PA, USA) por 48h a 60 °C. Cortes ultrafinos obtidos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2Spirit Biotwin, FEI Company, Holanda), operado a 100KV.

#### **4.5.2 Análise por citometria de fluxo**

##### **4.5.2.1 Efeito necrótico e/ou apoptótico em formas epimastigotas de *T. cruzi*.**

Para identificar o potencial necrótico e/ou apoptótico dos peptídeos mais promissores, foram utilizados o marcador de apoptose por externalização da fosfatidilserina Anexina V-PE e o marcador de necrose por lesão de membrana plasmática 7-AAD. As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas, tratadas nas concentrações de 2,00 $\mu$ M, 4,01 $\mu$ M para o peptídeo Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39  $\mu$ M, 4,79  $\mu$ M para Hmc364-382 caracterizando respectivamente sua IC<sub>50/2</sub>, IC<sub>50</sub> e incubadas por 24 horas em placa de 24 poços em estufa de BOD a 28 °C. Após esses períodos, as culturas foram lavadas e marcadas com um conjugado de Anexina V-PE e 7-AAD, utilizando um kit comercial (Sigma- Aldrich). Células tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo. Após 15 minutos de incubação no escuro, os parasitos foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos (BANDEIRA *et al.*, 2017).

##### **4.5.2.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).**

Para a avaliação de EROs, utilizou-se o marcador DCF para a citometria de fluxo. Este marcador na presença de EROs, apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência. Dessa forma, a fluorescência observada

umenta proporcionalmente à produção de EROs. As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas, tratadas nas concentrações de  $2,00\mu\text{M}$ ,  $4,01\mu\text{M}$  para o peptídeo Hmc666-678 e nas concentrações de  $2,39\mu\text{M}$ ,  $4,79\mu\text{M}$  para Hmc364-382 caracterizando respectivamente sua  $IC_{50/2}$ ,  $IC_{50}$  e incubadas por 24 horas em placa de 24 poços em estufa de BOD a  $28^\circ\text{C}$ . Células tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo. Após esse período as células foram lavadas e marcadas com DCF (2',7'-diclorofluoresceína) por 30 minutos no escuro. Ao final, os parasitos foram lavados novamente e colhidos para análise por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

#### **4.5.2.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ).**

Para os ensaios de potencial transmembrânico mitocondrial foi utilizado o marcador Rhodamina 123 (Sigma-Aldrich). A rodamina é um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias intactas livres de danos, emitindo fluorescência vermelha. Alterações no potencial transmembrânico mitocondrial causa redução do acúmulo do marcador (BARACCA *et al.*, 2003).

As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas, tratadas nas concentrações de  $2,00\mu\text{M}$ ,  $4,01\mu\text{M}$  para o peptídeo Hmc666-678 e nas concentrações de  $2,39\mu\text{M}$ ,  $4,79\mu\text{M}$  para Hmc364-382 caracterizando respectivamente sua  $IC_{50/2}$ ,  $IC_{50}$  incubadas por 24h em estufa de BOD a  $28^\circ\text{C}$ . Após esse período, as células foram lavadas e marcadas com rodamina (Rho123)  $10\mu\text{g/mL}$  por 30 minutos no escuro. Células tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo. Em seguida, as células lavadas foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos (MELLO *et al.*, 2017).

#### **4.5.2.4 Avaliação de indução de autofagia**

Para avaliar a morte celular autofágica, utilizou-se o marcador laranja de acridina por citometria de fluxo. Este marcador permite a visualização de organelas vesiculares ácidas, uma vez que é um marcador acidotrópico. Ao penetrar na célula apresenta fluorescência verde e ao ficar retido em organelas ácidas (característica de fagossomo) emite fluorescência vermelha. As formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas, tratadas nas

concentrações de 2,00 $\mu$ M, 4,01 $\mu$ M para o peptídeo Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39 $\mu$ M, 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 caracterizando respectivamente sua IC<sub>50/2</sub>, IC<sub>50</sub> e incubadas por 24 horas em placa de 24 poços em estufa de BOD a 28 °C. Após esse período, as células foram lavadas e marcadas com laranja de acridina 5  $\mu$ g/mL por 30 minutos no escuro. Células tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo (SANDES *et al.*, 2014). Em seguida, as células lavadas foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Para cada amostra foram considerados no mínimo dez mil eventos.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os ensaios foram realizados em triplicata de três experimentos independentes e os resultados obtidos expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e os valores de IC<sub>50</sub> determinadas por regressão não linear com intervalo de confiança 95%. Comparações estatísticas foram analisadas utilizando ANOVA com *Bonferroni's post-test* no programa GraphPad Prism ® versão 5.0.

# Resultados

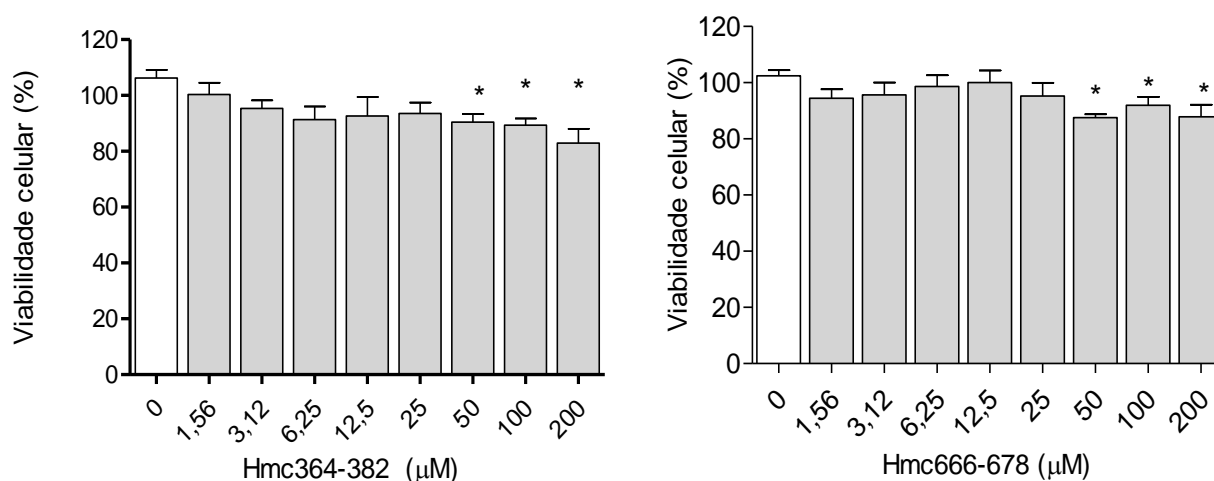
---

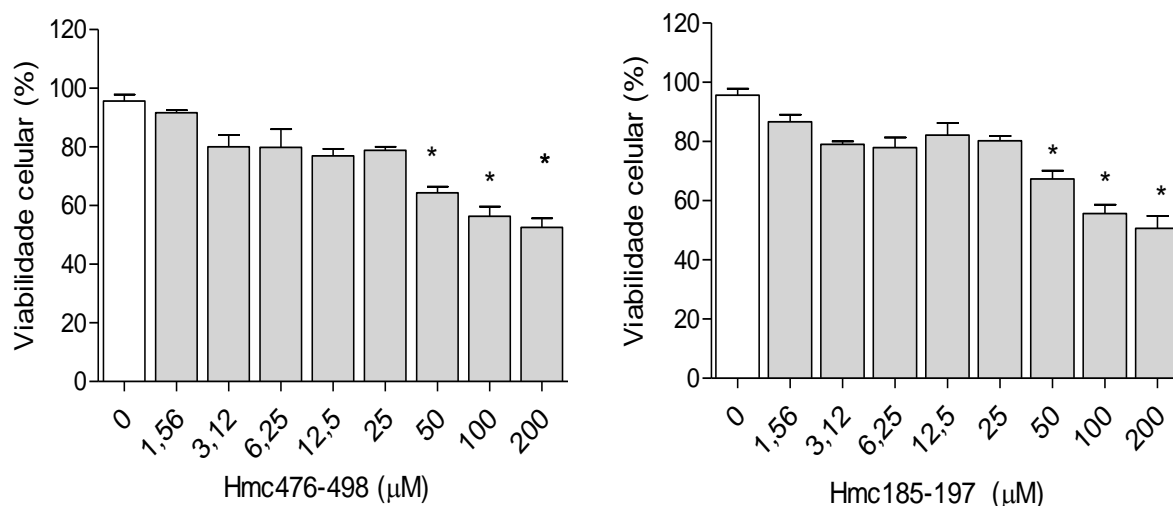
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon* em células LLC-MK2.

Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade dos peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382, Hmc185-197 e Hmc476-498 foram realizadas nas células LLC-MK-2, uma vez que as mesmas foram escolhidas como hospedeiras do *Trypanosoma cruzi*. Desta forma, as células foram incubadas por 24h na presença dos peptídeos estudados nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56  $\mu\text{M}$ , assim tiveram sua viabilidade determinada pela leitura espectrofotométrica do ensaio de MTT. Foi observado, de acordo com a figura 10, que apenas nas maiores concentrações (200; 100 e de 50  $\mu\text{M}$ ) houve dano celular significativo causados pelos quatro peptídeos estudados. Também foi possível calcular as  $\text{IC}_{50}$  dos peptídeos testados baseado em sua viabilidade celular, a mesma foi calculada em relação ao controle cuja absorbância foi considerada 100%. Para os os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 a  $\text{IC}_{50}$  foi calculado por extrapolação sendo observado respectivamente a a  $\text{IC}_{50}$  de 513,2  $\mu\text{M}$  e 473,3  $\text{Mm}$ . Para Hmc476-498 foi obtido a  $\text{IC}_{50}$  de 142,1  $\mu\text{M}$  e de 145,7  $\mu\text{M}$  para Hmc185-197.

**Figura 10.** Efeito citotóxico de Hmc666-678, Hmc364-382, Hmc185-197, Hmc476-498 sobre as células LLC-MK2.





Legenda: Os gráficos representam o percentual de viabilidade celular, expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n=3). O grupo controle (onde foi identificado como 0) foi tratado com PBS. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Bonferroni's*, com  $*p < 0,05$  vs o grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 4** – Viabilidade celular das células LLC-MK2 submetidas ao método do MTT após tratamnto com os peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382.

	Viabilidade celular (%)		Viabilidade celular (%)
Controle	100,8 $\pm$ 8,02	Controle	100,29 $\pm$ 8,02
Hmc364-382 0,19 $\mu$ M	95,04 $\pm$ 7,58	Hmc666-678 0,19 $\mu$ M	97,48 $\pm$ 4,64
Hmc364-382 0,39 $\mu$ M	91,02 $\pm$ 2,09	Hmc666-678 0,39 $\mu$ M	96,10 $\pm$ 3,76
Hmc364-382 0,78 $\mu$ M	94,44 $\pm$ 4,56	Hmc666-678 0,78 $\mu$ M	100,90 $\pm$ 6,23
Hmc364-382 1,56 $\mu$ M	100,31 $\pm$ 3,87	Hmc666-678 1,56 $\mu$ M	94,45 $\pm$ 8,49
Hmc364-382 3,12 $\mu$ M	95,35 $\pm$ 8,96	Hmc666-678 3,12 $\mu$ M	95,64 $\pm$ 7,51
Hmc364-382 6,25 $\mu$ M	91,36 $\pm$ 7,54	Hmc666-678 6,25 $\mu$ M	98,69 $\pm$ 7,53
Hmc364-382 12,5 $\mu$ M	92,63 $\pm$ 5,65	Hmc666-678 12,5 $\mu$ M	100,01 $\pm$ 4,96
Hmc364-382 25,0 $\mu$ M	93,56 $\pm$ 5,09	Hmc666-678 25,0 $\mu$ M	95,25 $\pm$ 7,04
Hmc364-382 50,0 $\mu$ M	80,47 $\pm$ 5,32	Hmc666-678 50,0 $\mu$ M	85,81 $\pm$ 6,89

Legenda: Os dados representam o percentual de viabilidade celular, expresso em média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n=3). O grupo controle foi tratado com PBS. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Bonferroni's*, com  $*p < 0,05$  vs o grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.



**Tabela 5.** Viabilidade celular das células LLC-MK2 submetidas ao método do MTT após tratamento com os peptídeos Hmc185-197 e Hmc476-498.

	Viabilidade celular (%)		Viabilidade celular (%)
Controle	100,65 ± 4,35	Controle	100,65±4,35
Hmc476-498 0,19 µM	92,67±6,44	Hmc185-197 0,19 µM	91±1,00
Hmc476-498 0,39 µM	80,27±1,19	Hmc185-197 0,39 µM	91,33±0,67
Hmc476-498 0,78 µM	72,36±5,73	Hmc185-197 0,78 µM	80,24±1,24
Hmc476-498 1,56 µM	75,81±4,05	Hmc185-197 1,56 µM	78,18±1,82
Hmc476-498 3,12 µM	73,36±2,46	Hmc185-197 3,12µM	77,70±2,30
Hmc476-498 6,25 µM	82,15±0,46	Hmc185-197 6,25 µM	77,96±5,89
Hmc476-498 12,5µM	74,53±1,16	Hmc185-197 12,5 µM	82,15±5,73
Hmc476-498 25,0 µM	67,39±2,06	Hmc185-197 25,0 µM	80,27±2,06
Hmc476-498 50,0 µM	56,36±1,79	Hmc185-197 50,0 µM	67,39±1,19

Legenda: Os dados representam o percentual de viabilidade celular, expresso em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n=3). O grupo controle foi tratado com PBS. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Bonferroni's*, com \*p<0,05 vs o grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

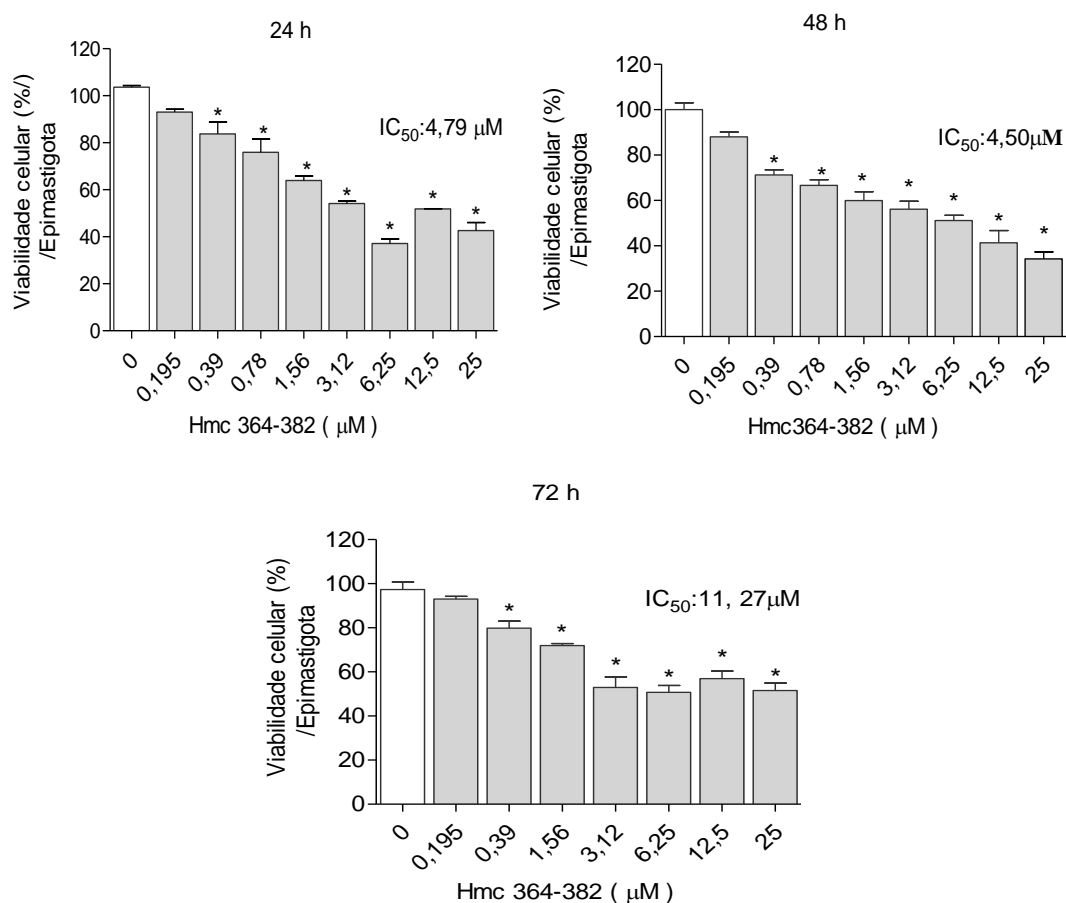
## 5.2 Avaliação da atividade antichagásica dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon*.

### 5.2.1 Efeito dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon* em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

As formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foram tratadas com os peptídeos derivados da hemocianina nos tempos de 24, 48 e 72h para avaliação do potencial tripanocida dessas substâncias em questão. Foi observado um efeito inibitório sobre essa forma evolutiva a partir da concentração de 0,39 µM para Hmc666-678 e Hmc364-382 (figuras 11 e 12) entretanto para o Hmc476-498 foi encontrado efeito inibitório a partir de 6,25 µM e 3,12 µM para o Hmc185-197 (figuras 13 e 14). Os grupos tratados com o diluente (PBS) foram utilizados como controle e não apresentaram redução na viabilidade celular nos tempos analisados. Por fim foram obtidos, os valores para Hmc364-382 de IC<sub>50</sub>/24h = 4,79 ± 1,34 µM; IC<sub>50</sub>/48h = 4,50 ± 1,40µM; IC<sub>50</sub>/72h = 11,27 ±4,46 µM, para o

Hmc666-678:  $IC_{50}/24h = 4,01 \pm 1,40\mu M$ ;  $IC_{50}/48h = 4,88 \pm 1,50 \mu M$ ;  $IC_{50}/72h = 8,83 \pm 4,21\mu M$ , para Hmc476-498  $IC_{50}/24h = 24,22 \pm 3,89 \mu M$ ;  $IC_{50}/48h = 25,63 \pm 2,98 \mu M$  e  $IC_{50}/72h = 22,13 \pm 2,65 \mu M$  e para o Hmc185-197 a  $IC_{50}/24h = 34,14 \pm 2,64 \mu M$ ;  $IC_{50}/48h = 86,06 \pm 1,87 \mu M$ ;  $IC_{50}/72h = 90,86 \pm 4,98 \mu M$ .

**Figura 11-** Efeito citotóxico de Hmc364-382 sobre a forma epimastigota de *T.cruzi*.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por one-way ANOVA com pósteste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

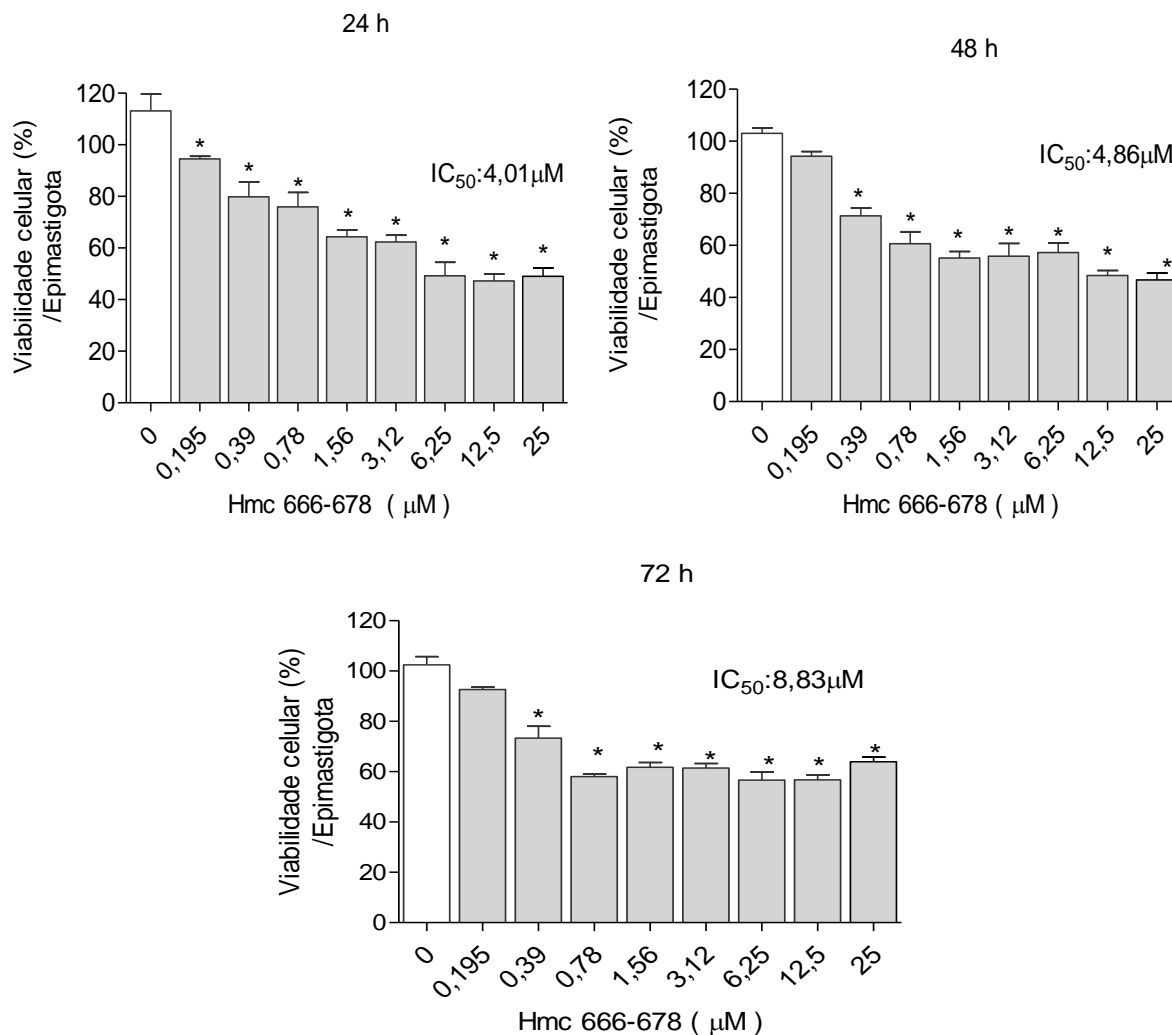
**Tabela 6** – Viabilidade celular das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com Hmc364-382.

	Viabilidade celular (%) das formas Epimastigotas		
	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	100,18 ±1,54	100,07 ±3,47	100,49 ±1,21
Hmc364-382 0,19 µM	94,57 ± 4,65	94,29 ±0,33	92,69 ±2,01
Hmc364-382 0,39 µM	79,85 ± 6,80	71,35 ±6,83	73,33 ±6,70
Hmc364-382 0,78 µM	75,97 ± 7,19	60,64 ±2,55	61,79 ±0,62
Hmc364-382 1,56 µM	64,30 ± 3,70	55,89 ±0,86	61,46 ±5,21
Hmc364-382 3,12 µM	62,37 ±6,37	55,18 ±6,51	58,03 ±1,04
Hmc364-382 6,25 µM	49,24 ±6,98	57,30 ±3,71	56,73 ±7,89
Hmc364-382 12,0 µM	47,30 ±4,44	48,45 ±2,85	56,69 ±6,73
Hmc364-382 25,0 µM	49,09 ±5,09	46,74 ±6,8	63,92 ±1,62

Legenda: Os dados representam o percentual de viabilidade celular, expresso em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n=3). O grupo controle foi tratado com PBS. Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Bonferroni's*, com \*p<0,05 vs o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autora.

**Figura 12** - Efeito citotóxico de Hmc666-678 sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's* t. \*p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os dados representam o tratamento por 24 horas, 48 horas, 72 horas. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \*p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

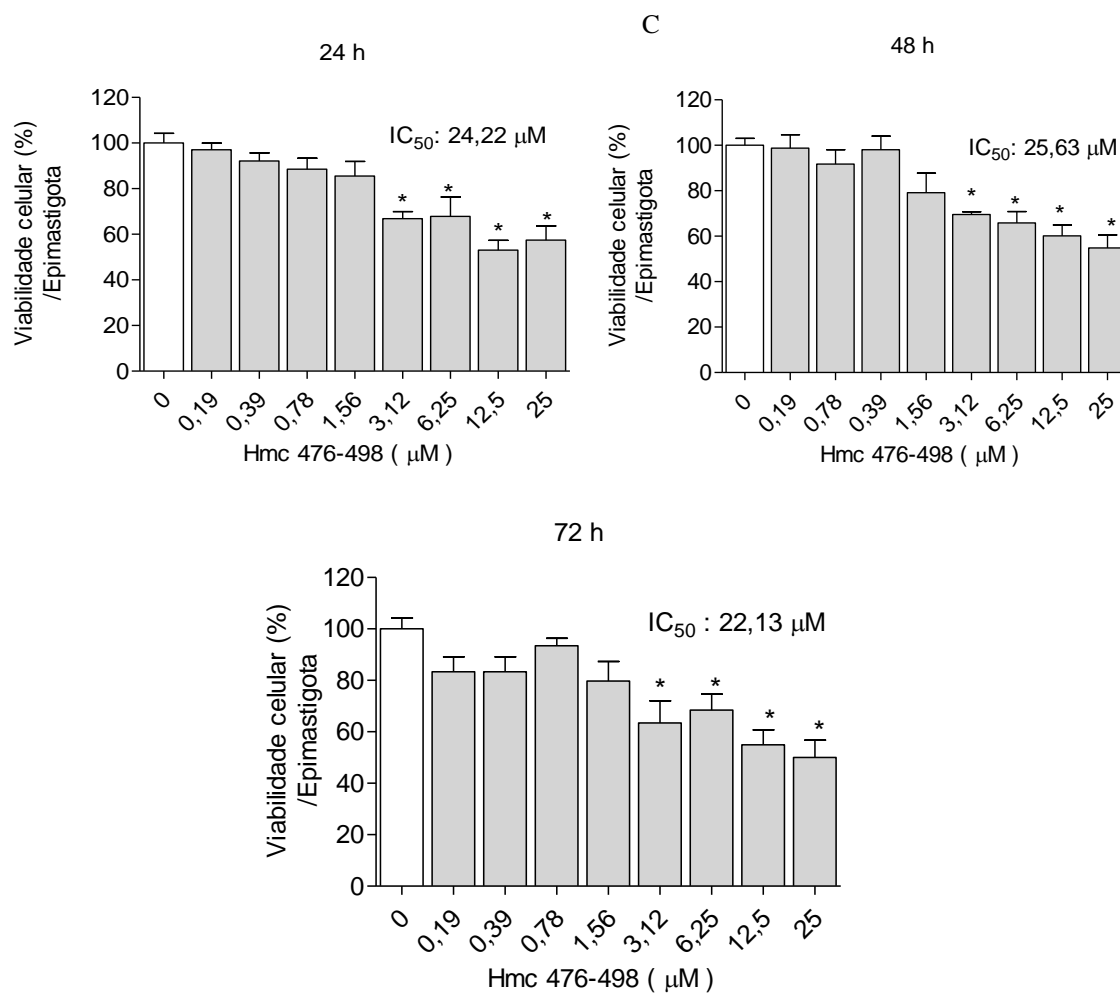
**Tabela 7-** Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com HMC666-678.

	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	100,62 ± 0,37	100 ± 6,4	97,345 ± 1,76
0,19 µM	93,02 ± 4,65	88,00 ± 4,66	93,02 ± 4,65
0,39 µM	83,72 ± 4,65	71,29 ± 6,3	79,83 ± 3,90
0,78 µM	75,97 ± 6,07	66,62 ± 6,2	71,97 ± 0,85
1,56 µM	63,96 ± 4,03	59,95 ± 4,75	52,98 ± 3,41
3,12 µM	54,17 ± 1,79	56,12 ± 6,00	50,70 ± 4,09
6,25 µM	37,17 ± 4,2	51,18 ± 6,43	56,99 ± 3,11
12,5 µM	51,88 ± 0,496	41,31 ± 3,50	51,59 ± 6,66

Legenda: Os dados representam o tratamento por 24 horas, 48 horas e 72 horas e. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's t*. \*p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 13** - Efeito citotóxico de Hmc476-498 sobre a forma epimastigota de *T.cruzi*.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas, 48 horas e 72 horas e. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's t*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

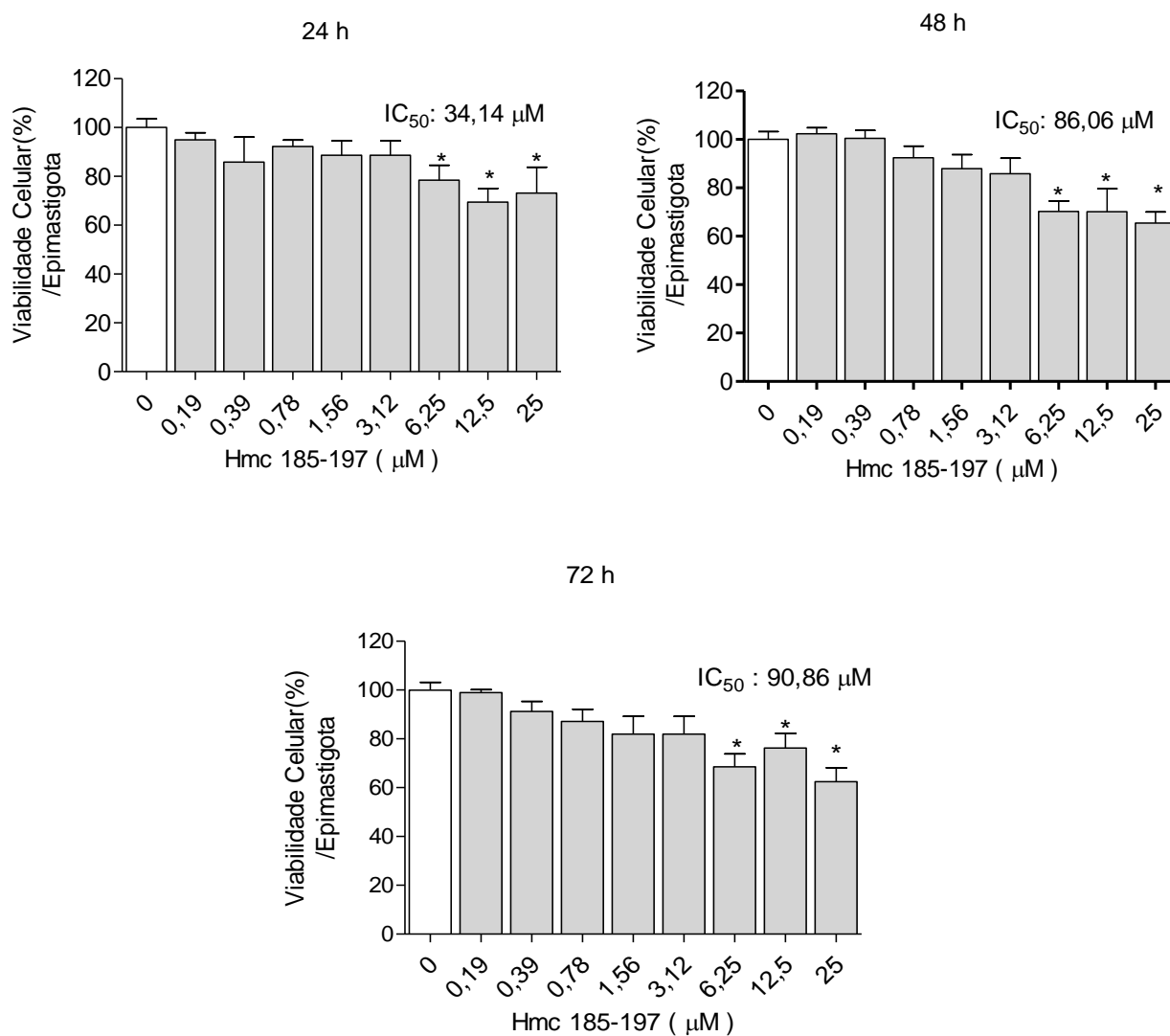
**Tabela 8** – Viabilidade celular (média  $\pm$  EPM) das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após incubação com Hmc476-498.

	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	100,28 $\pm$ 8,0	100,18 $\pm$ 10,09	100,84 $\pm$ 1,15
0,19 $\mu$ M	96,11 $\pm$ 4,89	92,08 $\pm$ 6,91	98,04 $\pm$ 5,02
0,39 $\mu$ M	91,6 $\pm$ 6,98	87,65 $\pm$ 8,98	87,39 $\pm$ 3,70
0,78 $\mu$ M	91,4 $\pm$ 6,09	84,39 $\pm$ 6,39	96,43 $\pm$ 3,79
1,56 $\mu$ M	91,3 $\pm$ 7,98	77,99 $\pm$ 10,38	87,70 $\pm$ 5,02
3,12 $\mu$ M	66,10 $\pm$ 7,76	70,71 $\pm$ 0,54	71,75 $\pm$ 10,06
6,25 $\mu$ M	80,34 $\pm$ 9,85	53,49 $\pm$ 5,50	74,91 $\pm$ 5,36
12,5 $\mu$ M	60,06 $\pm$ 3,09	51,98 $\pm$ 1,23	59,68 $\pm$ 5,77
25,0 $\mu$ M	46,77 $\pm$ 2,59	41,37 $\pm$ 2,54	55,46 $\pm$ 5,00

Legenda: Os dados representam o tratamento por 24 horas, 48 horas, 72 horas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 14** - Efeito citotóxico de Hmc185-197 sobre a forma epimastigota de *T.cruzi*.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas, 48 horas e 72 horas e. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's* t. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.



**Tabela 9** – Viabilidade celular das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com Hmc185-197.

	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	100,28±9,39	100,32±2,66	100,07±2,73
0,19 µM	98,47±4,31	99,5±0,50	98,06±0,29
0,39 µM	97,89±4,78	95,67±1,32	86,33±10,02
0,78 µM	97,27±5,50	86,43±0,57	84,00±9,98
1,56 µM	90,98±0,83	77,67±5,6	84,09±7,98
3,12 µM	89,41±0,89	73,50±9,22	83,89±9,45
6,25 µM	88,94±0,64	65,53±5,79	73,85±7,12
12,50 µM	81,94±0,87	60,11±0,96	74,70±6,28
25,00 µM	87,27±3,39	54,53±4,17	66,23±9,56

Legenda: Os dados representam o tratamento por 24 horas, 48 horas, 72 horas. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

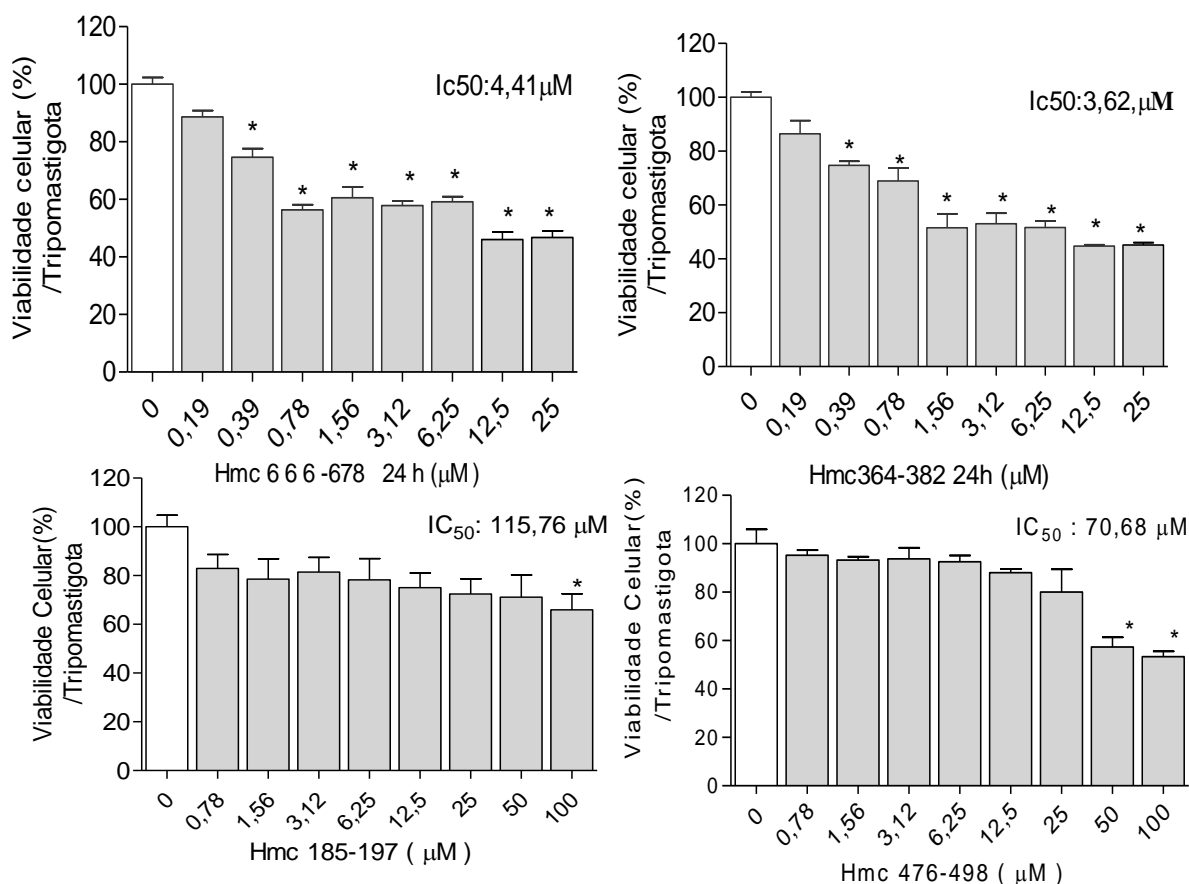
Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.2.2 Efeito dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon* em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

As formas tripomastigotas, obtidas a partir da ruptura de células LLC-MK2, foram incubadas com as concentrações dos peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382, Hmc185-197 e Hmc476-498 (12,5; 6,25; 3,12; 1,56 ;0,78; 0,39; 0,19 µM) durante 24h. De acordo com a figura 15, o Hmc364-382 e Hmc666-678, apresentaram toxicidade para os parasitos a partir das concentrações 0,19 µM e conferindo assim uma IC<sub>50</sub> de 3,62 ± 2,53 µM para Hmc364-382 e 4,41 ± 1,72 µM para Hmc666-678, entretanto para o peptídeo Hmc476-498 aconteceu significativa morte parasitária a partir da concentração de 50µM e para Hmc185-197 a partir de 100, assim as IC<sub>50</sub> encontradas foram de 70,68 ± 3,46 µM para o Hmc476-498e de 0,97 ±3,87 para o Hmc185-197.

Para identificar a relação entre toxicidade dos peptídeos em relação as células LLC-MK2 e as formas parasitárias, foi calculado o índice de seletividade (IS) através da divisão entre a  $IC_{50}$  das LLC-MK2 e a  $IC_{50}$  das formas tripomastigotas. Como o teste de MTT foi realizado apenas até a concentração de 200  $\mu\text{M}$  o cálculo para uma média do índice de seletividade dos peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 foi utilizado como  $IC_{50}$  das LLC-MK2 o valor de 200  $\mu\text{M}$ , assim foi obtido o resultado de  $IS = 55,24 \mu\text{M}$  para Hmc364-382 e de 45,35  $\mu\text{M}$  para Hmc666-678, 1,99 $\mu\text{M}$  para o Hmc476-498 e de 1,27 $\mu\text{M}$  para o Hmc185-197.

**Figura 15** - Efeito citotóxico dos peptídeos derivados da hemocianina de *Penaeus monodon* sobre a forma tripomastigota de *T.cruzi*.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas, sob a forma tripomastigota. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 10** -Viabilidade celular das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678.

	24 horas		24 horas
Controle	100,00 ±6,89	Controle	100 ± 6,90
Hmc364-382 0,19 µM	77,15 ±4,71	Hmc666-678 0,19 µM	84,27 ± 4,95
Hmc364-382 0,39 µM	74,72 ±6,2	Hmc666-678 0,39 µM	74,61 ±6,63
Hmc364-382 0,78µM	68,95 ±9,80	Hmc666-678 0,78 µM	56,36 ±1,19
Hmc364-382 1,56µM	53,22 ±8,38	Hmc666-678 1,56 µM	60,52 ±1,89
Hmc364-382 3,12µM	51,92 ±5,5	Hmc666-678 3,12 µM	57,86 ±0,76
Hmc364-382 6,25µM	51,62 ±5,29	Hmc666-678 6,25 µM	59,18 ±6,4
Hmc364-382 12,0µM	44,77 ±0,22	Hmc666-678 12,0 µM	46,01 ±7,16
Hmc364-382 25,0µM	44,09±2,89	Hmc666-678 25,0 µM	45,98±4,17

Legenda: Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 11** -Viabilidade celular das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com os peptídeos Hmc476-498 e Hmc185-197.

	24 horas		24 horas
Controle	100±4,00	Controle	101,09±9,71
Hmc476-498 0,19 µM	96,75±1,75	Hmc185-197 0,19 µM	95,75±2,25
Hmc476-498 0,39 µM	96,5±3,50	Hmc185-197 0,39 µM	76,98±9,45
Hmc476-498 0,78 µM	95,25±0,25	Hmc185-197 0,78 µM	86,22±10,98
Hmc476-498 1,56 µM	93,35±1,75	Hmc185-197 1,56 µM	83,32±8,54
Hmc476-498 3,12 µM	92,75±3,25	Hmc185-197 3,12 µM	81,78±0,22
Hmc476-498 6,25 µM	92,50±0,50	Hmc185-197 6,25 µM	75,88±10,55
Hmc476-498 12,5 µM	88,00±2,66	Hmc185-197 12,5 µM	74,69±10,50
Hmc476-498 25,00µM	80,00±6,98	Hmc185-197 25,00 µM	73,70±2,74
Hmc476-498 50,0 µM	57,33±4,00	Hmc185-197 50,0 µM	69,14±3,20
Hmc476-498 100,0 µM	52,98±5,33	Hmc185-197 100,0 µM	65,71±1,55

Legenda: Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de *Bonferroni's*. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 12** – Resumo da atividade biológica *in vitro* dos peptídeos derivados da hemocianina do *Penaeus monodon* sobre células LLC-MK2 e formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y.

	Tempo de incubação		
	24 horas	48 horas	72 horas
<b>Hmc364-382</b>			
IC <sub>50</sub> (LLC-MK2)	>200 $\mu$ M	-	-
IC <sub>50</sub> (Epimastigotas) <sup>(b)</sup>	4,79 $\mu$ M	4,50 $\mu$ M	11,27 $\mu$ M
IC <sub>50</sub> (Tripomastigotas) <sup>(c)</sup>	3,62 $\mu$ M	-	-
IS <sup>(d)</sup>	>55,24	-	-
<b>Hmc666-678</b>			
IC <sub>50</sub> (LLC-MK2) <sup>(a)</sup>	>200 $\mu$ M	-	-
IC <sub>50</sub> (Epimastigotas) <sup>(b)</sup>	4,01 $\mu$ M	4,86 $\mu$ M	8,83 $\mu$ M
IC <sub>50</sub> (Tripomastigotas) <sup>(c)</sup>	4,41 $\mu$ M	-	-
IS <sup>(d)</sup>	>45,35	-	-
<b>Hmc476-498</b>			
IC <sub>50</sub> (LLC-MK2) <sup>(a)</sup>	114,00 $\mu$ M		
IC <sub>50</sub> (Epimastigotas) <sup>(b)</sup>	24,22 $\mu$ M	25,63 $\mu$ M	22,13 $\mu$ M
IC <sub>50</sub> (Tripomastigotas) <sup>(c)</sup>	70,68 $\mu$ M	-	-
IS <sup>(d)</sup>	1,99	-	-
<b>Hmc185-197</b>			
IC <sub>50</sub> (LLC-MK2) <sup>(a)</sup>	113,2 $\mu$ M		
IC <sub>50</sub> (Epimastigotas) <sup>(b)</sup>	34,14 $\mu$ M	86,06 $\mu$ M	90,86 $\mu$ M
IC <sub>50</sub> (Tripomastigotas) <sup>(c)</sup>	115,76 $\mu$ M	-	-
IS <sup>(d)</sup>	1,27	-	-

Legenda: <sup>(a)</sup> IC<sub>50</sub> = concentração capaz de causar 50% de toxicidade em células hospedeiras; <sup>(b)</sup> IC<sub>50</sub> = concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das formas epimastigotas; <sup>(c)</sup> IC<sub>50</sub> = concentração capaz de causar morte de 50% das formas tripomastigotas; <sup>(d)</sup> IS = Índice de seletividade.

Fonte: Elaborado pela autora.

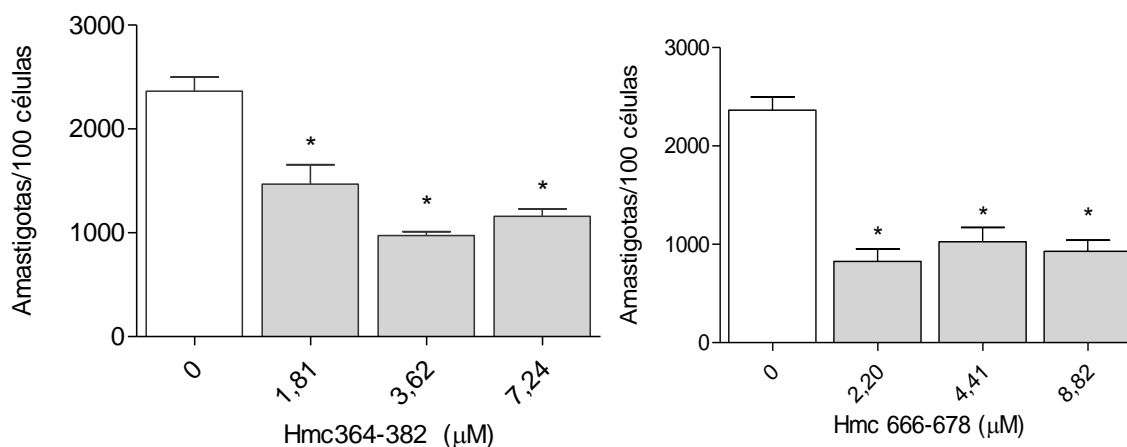
### 5.2.3 Efeito de Hmc364-382 e Hmc666-678 em formas amastigotas de *T. cruzi*.

Com o objetivo de mensurar o efeito dos peptídeos mais promissores, foi realizado experimentos com Hmc364-382 e Hmc666-678 sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*, forma amastigota, no tempo de 24 horas. Para o Hmc364-382 foi testado as concentrações de 1,81 $\mu$ M; 3,62  $\mu$ M e 7,24  $\mu$ M caracterizando respectivamente a IC<sub>50/2</sub>, IC<sub>50</sub> e 2xIC<sub>50</sub> da forma tripomastigota. Foram testadas as concentrações 2,20 $\mu$ M; 4,41 e 8,82 caracterizando respectivamente a IC<sub>50/2</sub>, IC<sub>50</sub> e 2xIC<sub>50</sub> da forma tripomastigota para o peptídeo Hmc666-678. Os parâmetros avaliados foram o número de amastigotas por 100 células e percentual de células infectadas.

Foi observado de acordo com a figura 16 que ocorreu uma redução significativa no número de amastigotas por célula com o tratamento de ambos os peptídeos em relação ao controle nas concentrações testadas, sendo possível alcançar uma redução de até 61% na concentração de IC<sub>50</sub> para Hmc364-382 e a redução de até 65% na concentração de IC<sub>50/2</sub> para Hmc666-678. Não foi evidenciada relação dose-resposta e diferença estatística entre as concentrações testadas.

Por fim, foi analisada a diferença estatística entre número de células não infectadas entre controle e o tratamento com os peptídeos estudados, demonstrado na figura18, onde foi observado que não houve diferença estatística no número de células não infectadas em relação a dose testada. Também foi realizada a fotomicrografia, observada nas figuras 17 e 18.

**Figura 16** - Efeito citotóxico de Hmc364-382 e Hmc666-678 sobre a forma amastigota de *T.cruzi*.



Legenda: Amastigotas por 100 células em células tratadas com os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 após 24 de incubação. O gráfico representa a média ± E.P.M, de experimentos independente (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste de Bonferroni, com  $*p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 13** - Valores numéricos obtidos no ensaio de atividade anti-amastigota *in vitro* dos peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678.

Número de amastigotas por 100 células			
Hmc364-382		Hmc666-678	
Controle	2620,19 <sup>(b)</sup>	Controle	2620,19 <sup>(b)</sup>
1,81 μM <sup>(a)</sup>	1469,11 <sup>(b)</sup>	2,20 μM <sup>(a)</sup>	827,33 <sup>(b)</sup>
3,62 μM <sup>(a)</sup>	973,33 <sup>(b)</sup>	4,41 μM <sup>(a)</sup>	1026,02 <sup>(b)</sup>
7,24 μM <sup>(a)</sup>	1158,66 <sup>(b)</sup>	8,82 μM <sup>(a)</sup>	927,66 <sup>(b)</sup>

Legenda: Número amastigotas por 100 células tratadas com os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 após 24 de incubação em relação ao controle. O gráfico representa a média ± E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste de Bonferroni, com  $*p < 0,05$ . (a) Concentração testada; (b) número de amastigota em 100 células.

Fonte: Elaborado pela autora.

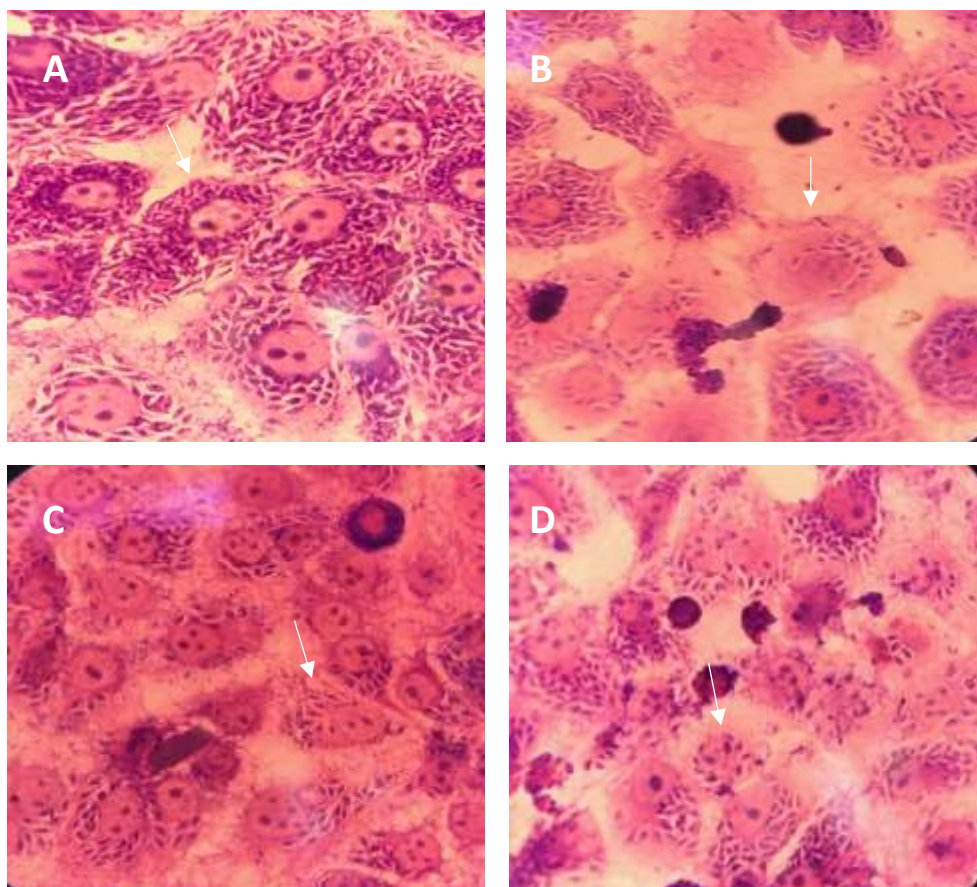
**Tabela 14** Valores numéricos obtidos no ensaio de atividade anti-mastigota *in vitro* dos peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 em relação ao número de células não infectadas.

Número de células Infectadas			
Hmc364-382		Hmc666-678	
Controle	100 <sup>(b)</sup>	Controle	100 <sup>(b)</sup>
1,81 $\mu\text{M}^{(a)}$	96 <sup>(b)</sup>	2,20 $\mu\text{M}^{(a)}$	94 <sup>(b)</sup>
3,62 $\mu\text{M}^{(a)}$	95 <sup>(b)</sup>	4,41 $\mu\text{M}^{(a)}$	87 <sup>(b)</sup>
7,24 $\mu\text{M}^{(a)}$	92 <sup>(b)</sup>	8,82 $\mu\text{M}^{(a)}$	88 <sup>(b)</sup>

Legenda: Número de células não infectadas por 100 células tratadas com os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 após 24 de incubação em relação ao controle. O gráfico representa a média  $\pm$  E.P.M, de experimentos independentes (n= 3). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste de Bonferroni, com  $*p < 0,05$ . (a) Concentração testada (b) Número de células infectadas.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 17:** Fotomicrografia das lamínas de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y submetidas ao ensaio de atividade anti-amastigota do peptídeo Hmc364-382 nas concentrações testadas.

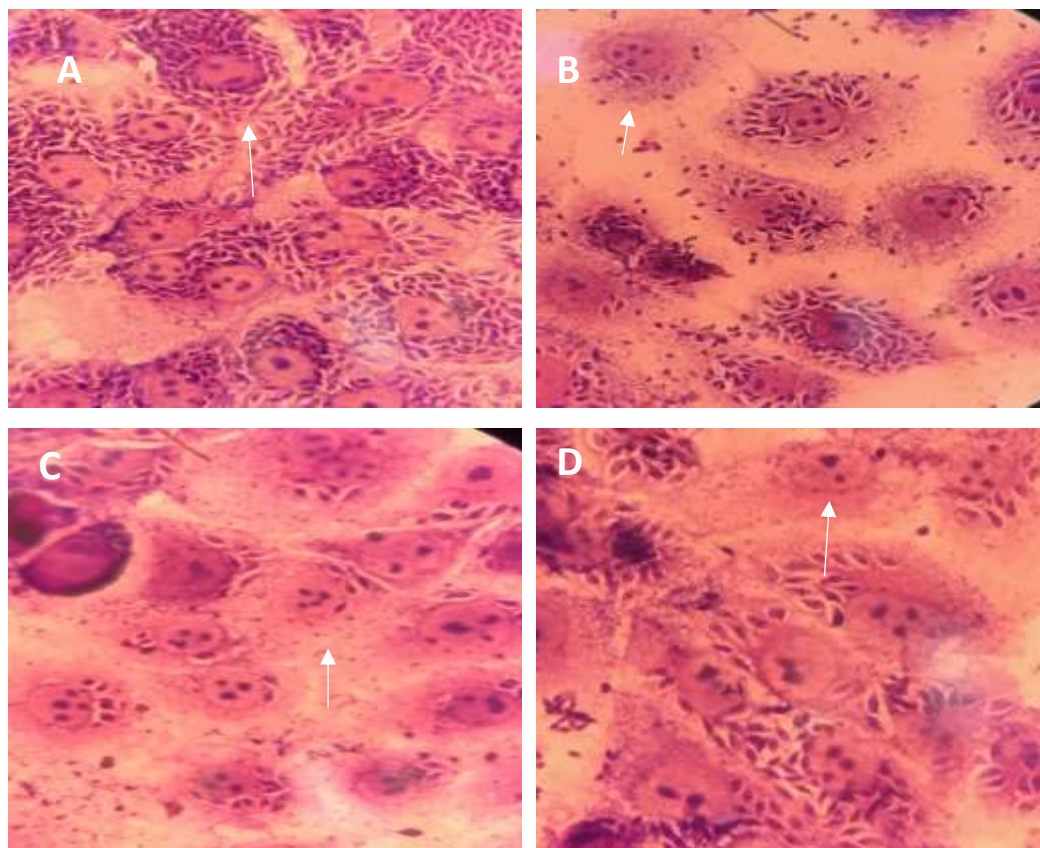


Legenda: (A) Grupo controle (Células LLC-MK2 infectadas com a cepa y de *T. cruzi*); (B) Grupo tratado com o peptídeo Hmc364-382 na concentração de 1,81 $\mu$ M ( $IC_{50/2}$ ); (C) Grupo tratado com o peptídeo Hmc364-382 na concentração de 3,62 $\mu$ M ( $IC_{50}$ ); (D) Grupo tratado com o peptídeo Hmc364-382 na concentração de 7,24 $\mu$ M ( $2 \times IC_{50}$ ); Aumento de 100x em microscópio óptico.

Fonte: Elaborado pela autora.



**Figura 18** Fotomicrografia das lamínas de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y submetidas ao ensaio de atividade anti-amastigota dos peptídeos e Hmc666-678 nas concentrações testadas.



Legenda: (A) Grupo controle (Células LLC-MK2 infectadas com a cepa y de *T. cruzi*); (B) Grupo tratado com o peptídeo Hmc66-678 na concentração de 2,20  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50/2}$ ); (C) Grupo tratado com o peptídeo Hmc666-678 na concentração de 4,41  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ); (D) Grupo tratado com o peptídeo Hmc666-678 na concentração de 8,82  $\mu\text{M}$  ( $2 \times \text{IC}_{50}$ ); Aumento de 100x em microscópio óptico.

Fonte: Elaborado pela autora.

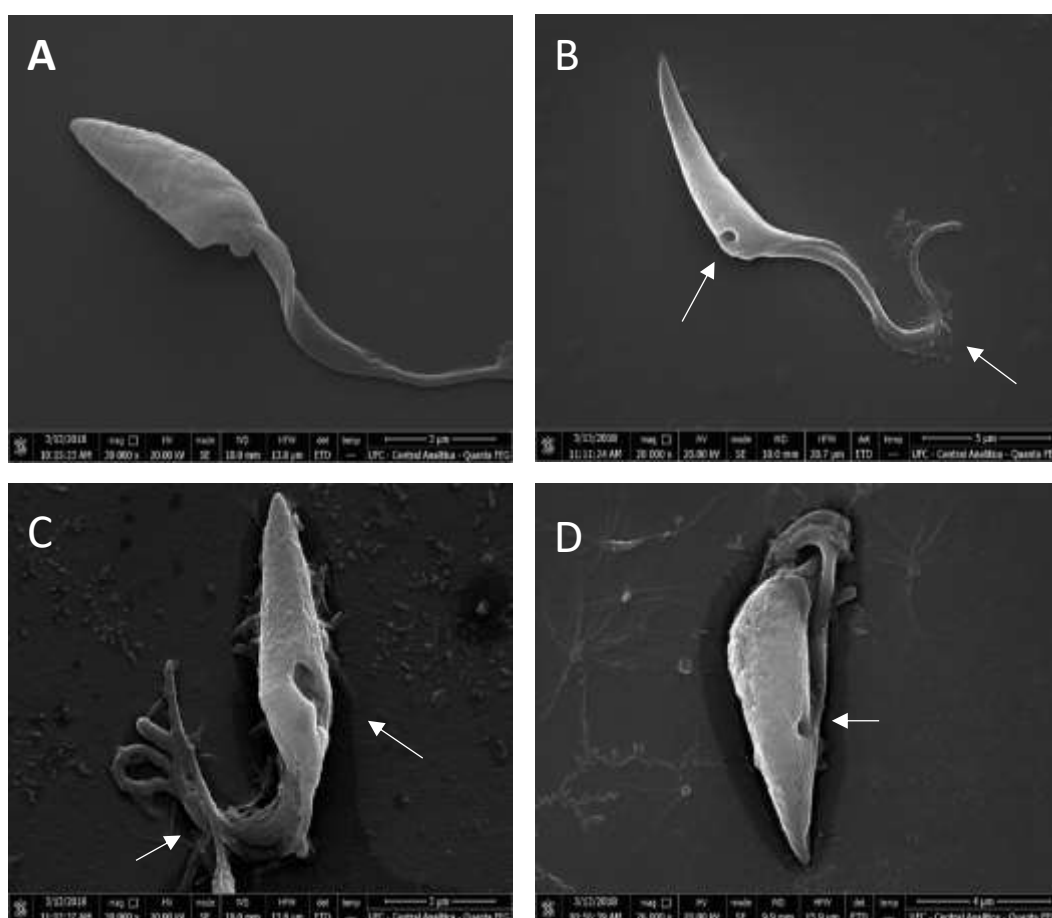
## 5.4 Investigação do mecanismo de ação

### 5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o tratamento de 24 horas nas concentrações de 2,39 $\mu\text{M}$ ; 4,79 $\mu\text{M}$  e de 9,59 $\mu\text{M}$  correspondente a  $\text{IC}_{50/2}$ ;  $\text{IC}_{50}$   $2 \times \text{IC}_{50}$  das formas epimastigotas para o peptídeo Hmc364-382 e de 2,00 $\mu\text{M}$ ; 4,01 $\mu\text{M}$  e 8,02 $\mu\text{M}$  caracterizando a  $\text{IC}_{50/2}$ ;

IC<sub>50</sub> e 2xIC<sub>50</sub> ds formas epimastigotas para o peptídeo Hmc666-678 foi realizada a análise por meio do microscópio eletrônico de varredura. Foram observadas de acordo com as figuras 19 e 20 alterações ultra estruturais nos parasitos expostos aos peptídeos, como por exemplo, o aparecimento de poros na membrana celular, alterações em seu formato típico e extravasamento da membrana. Porém, o tratamento com Hmc364-382, além das alterações já mencionadas, também causou diminuição do tamanho do parasito.

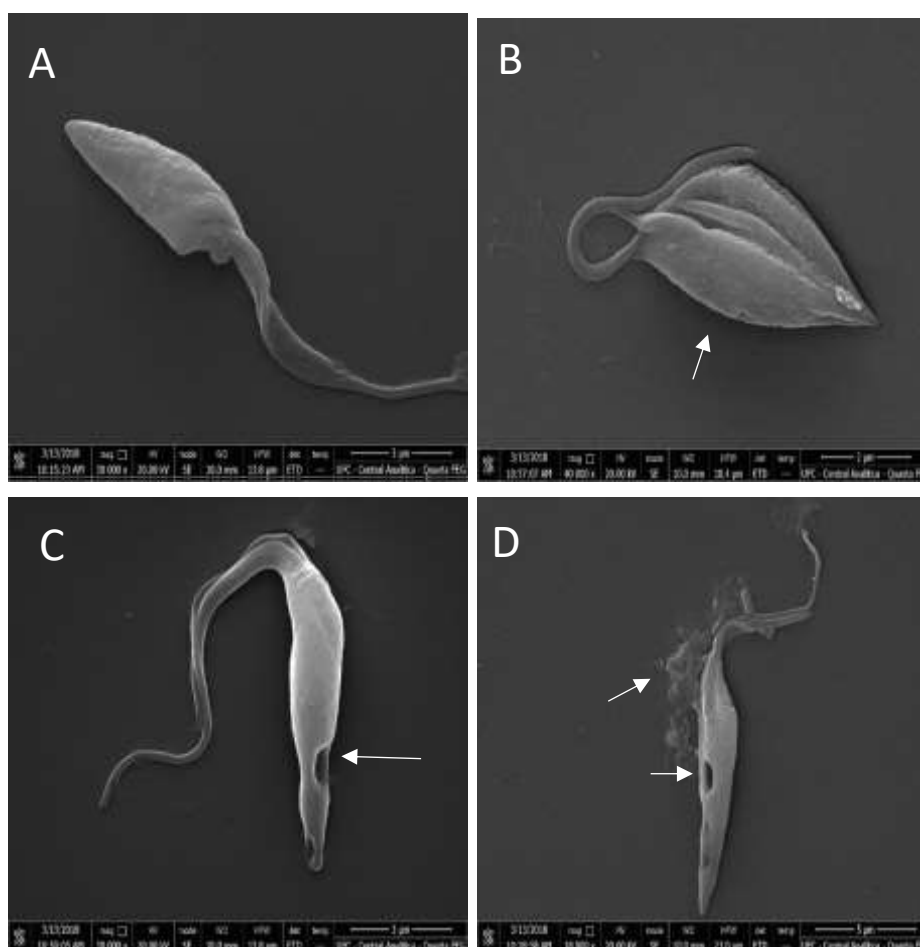
**Figura 19-** Modificações ultra estruturais causadas pelo peptídeo Hmc666-678.



Legenda: (A) grupo controle; (B) epimastigotas tratados com Hmc666-678 na concentração de 8,02 $\mu$ M (2xIC<sub>50</sub>), (C) epimastigotas tratados com Hmc666-678 na concentração de 4,01 $\mu$ M (IC<sub>50</sub>), (D) epimastigotas tratados com Hmc666-678 na concentração de 2,00 $\mu$ M (IC<sub>50/2</sub>). Demonstrando alterações no formato do parasito, aparecimento de poros em sua superfície e extravasamento celular.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 20-** Modificações ultra estruturais causadas pelo peptídeo Hmc364-382.



Legenda: (A) grupo controle; (B) epimastigotas tratados com Hmc364-382 na concentração de  $9,58\mu\text{M}$  ( $2\times\text{IC}_{50}$ ), (C) epimastigotas tratados com Hmc364-382 na concentração de  $4,79\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), (D) epimastigotas tratados com Hmc364-382 na concentração de  $2,39\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50/2}$ ). Demonstrando alterações no formato do parasito, aparecimento de poros em sua superfície e extravasamento celular.

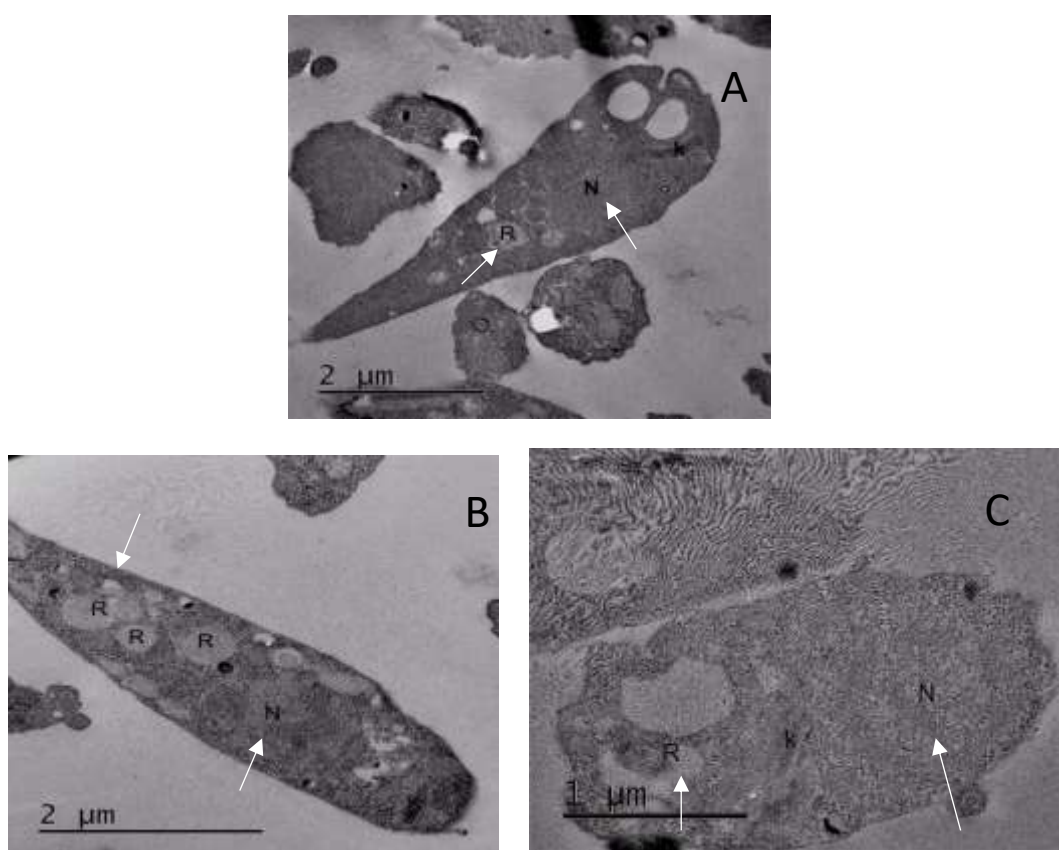
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

As análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas nas formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* após o tratamento de 12h, com os peptídeos derivado da hemocianina na concentração de  $\text{IC}_{50}$ . Foi observado que a forma epimastigota do grupo controle apresentava corpo alongado, organelas e membranas intactas e sem alterações no citoplasma e reservossomo pode ser visualizado na parte posterior do parasita, representado por A na figura 21. No grupo tratado com Hmc364-382, representado por B, na

figura 21, é possível observar a presença do aumento em tamanho e número reservossomos e uma leve desorganização da estrutura interna. Enquanto no grupo tratado com Hmc666-678, representado por C, na figura 21 é observado uma alteração e diminuição da forma estrutural do epimastigota, além de uma alteração da membrana plasmática, aumento em tamanho do reservosmo e desorganização intracelular.

**Figura 21:** Efeito dos peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382 na ultraestrutura de epimastigotas de *T. cruzi* analisado por microscopia eletrônica de transmissão.



Legenda: (A) Células controle apresentando corpo celular alongado com núcleo localizado centralmente, um citoplasma homogêneo e membrana plasmática intacta. (B) Célula tratada com Hmc364-382 na concentração de  $4,79\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), apresentando aumento no número e tamanho de reservossomos. (C) Célula tratada com Hmc666-678 na concentração de  $4,01\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), apresentando diminuição do tamanho e alteração da membrana plasmática e desorganização interna. Onde **K** significa kinetoplasto, **N** núcleo e **R** reservossomo.

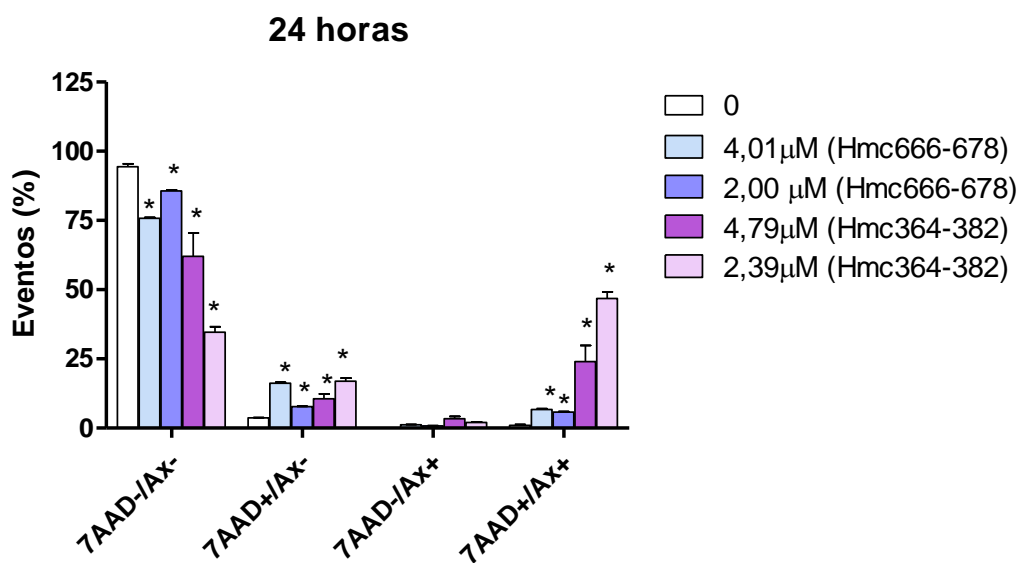
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.4.3 Avaliação da morte celular por necrose e ou/ apoptose.

Com o objetivo de identificar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas pelos peptídeos derivados da hemocianina de *P. monodon* as formas evolutivas epimastigotas foram tratadas por 24h submetidas ao protocolo de marcação por 7AAD e anexina V-PE nas concentrações de 2,39  $\mu\text{M}$  e 4,79  $\mu\text{M}$  para Hmc364-382 e as concentrações de 2,00  $\mu\text{M}$  e 4,01  $\mu\text{M}$  para Hmc666-678.

O peptídeo Hmc666-678 apresentou 8% de marcação 7AAD+/AX- e 6% 7AAD+/AX+ na concentração de 2,00  $\mu\text{M}$  enquanto que na concentração 4,01  $\mu\text{M}$  de foi 17% de marcação 7AAD+/AX- e 7 % 7AAD+/AX+. O peptídeo Hmc364-382 apresentou 20% de marcação 7AAD+/AX- e 49 % 7AAD+/AX+ na concentração de 2,39  $\mu\text{M}$  enquanto que na concentração de 4,79  $\mu\text{M}$  foi 14 % de marcação 7AAD+/AX- e 29% 7AAD+/AX+, bem como observados nas figuras 22 e 23.

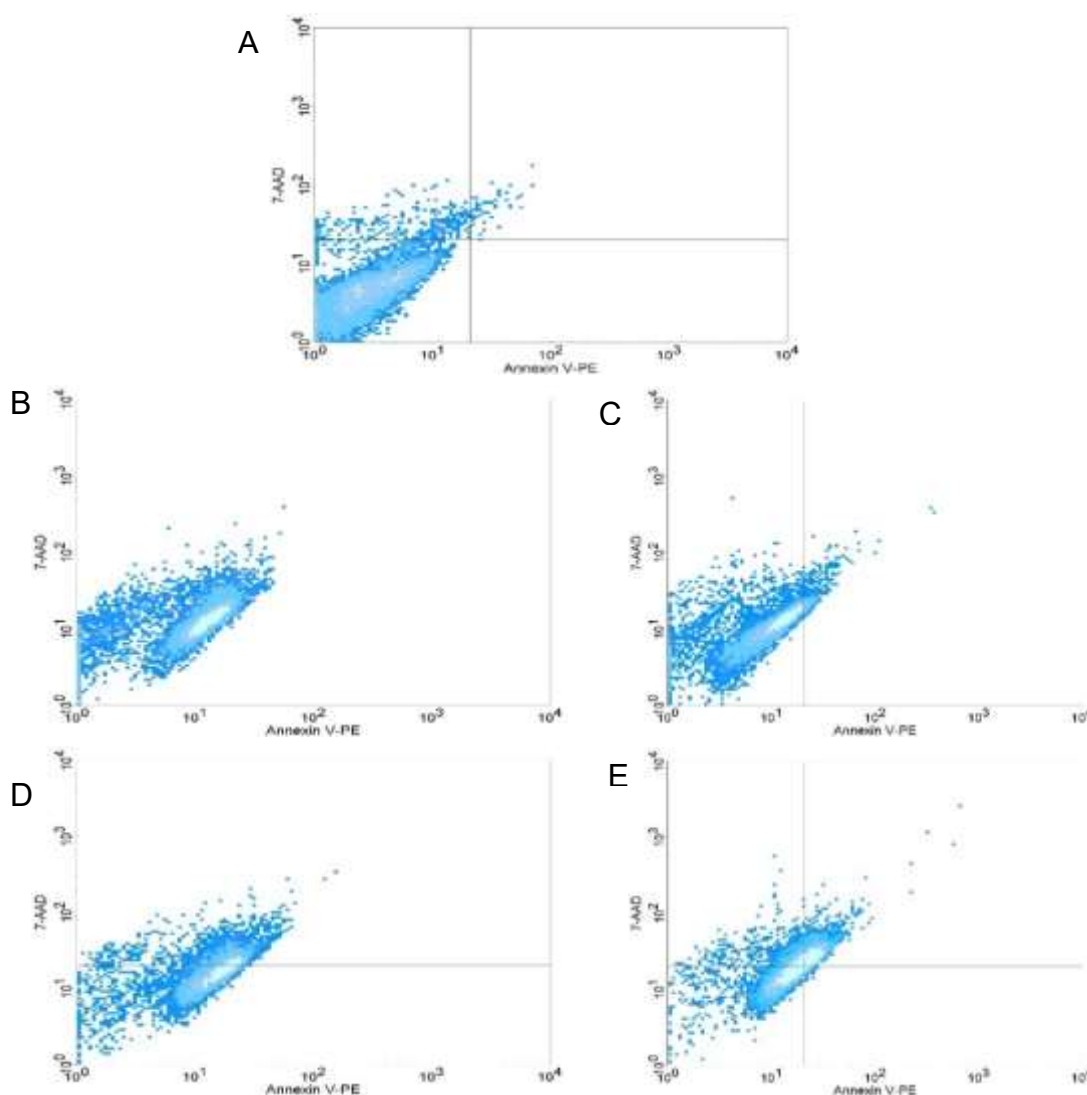
**Figura 22.** Perfil de morte em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com Hmc666-678 e Hmc364-382.



Legenda: Perfil de morte em formas epimastigotas após 24 h de tratamento nas concentrações com de 2,00  $\mu\text{M}$  e 4,01  $\mu\text{M}$  para Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39  $\mu\text{M}$  e 4,79  $\mu\text{M}$  para Hmc364-382. Os dados foram expressos como percentual de eventos  $\pm$  EPM de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni (\* $p < 0,05$  vs. grupo controle). 7AAD-/AX-: células não marcadas; 7AAD+/AX- : marcado com 7-amino actinomicina D; 7AAD-/AX+ : marcados com anexina V; 7AAD+/AX+ : marcado com 7-AAD e Anexina V-PE). 0: Controle.

Fonte: elaborado pela autora.

**Figura 23.** Perfil de morte celular da forma epimastigotas no tempo de 24 horas induzida por Hmc666-678 e Hmc364-382.



Legenda: (A) representa o controle, formas epimastigotas sem tratamento;(B) representa formas epimastigota sob tratamento de 24 horas na concentração de 4,01  $\mu\text{M}$  de Hmc666-678;(C) representa formas epimastigota sob tratamento de 24 horas na concentração de 2,00  $\mu\text{M}$  de Hmc666-678;(D) representa formas epimastigota sob tratamento de 24 horas na concentração de 4,79  $\mu\text{M}$  de Hmc364-382;(E) representa formas epimastigota sob tratamento de 24 horas na concentração de 2,39  $\mu\text{M}$  de Hmc364-382. Representação da marcação de Anexina V-PE e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7-AAD; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7-AAD e Anexina V-PE.

Fonte: elaborado pela autora.

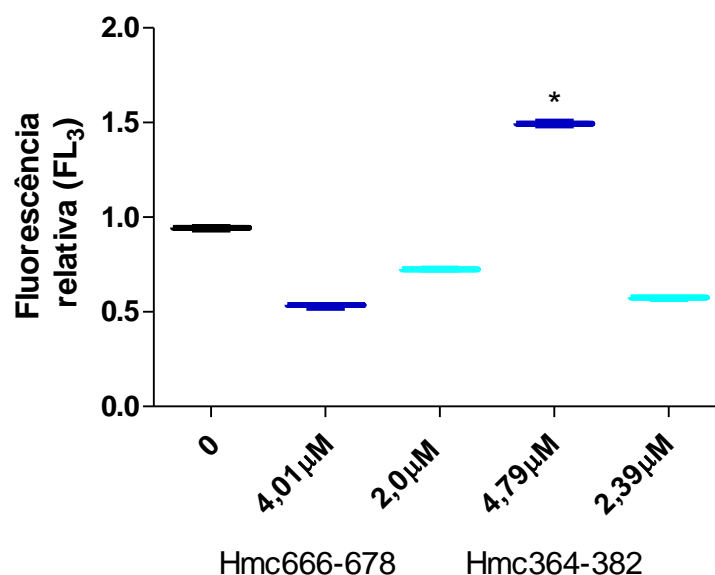
#### 5.4.4 Avaliação da morte celular por liberação de espécies reativas de oxigênio.

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

A análise da produção de EROs foi analisada após 24 horas de incubação de formas epimastigotas concentrações de 2,39 $\mu$ M e 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 e as concentrações de 2,00  $\mu$ M e 4,01  $\mu$ M para Hmc666-678.

Foi observado aumento de 50% de espécies reativas oxigênio para o peptídeo Hmc364-382 na concentração de 4,79  $\mu$ M, observado pelo deslocamento à direita da população tratada em relação ao grupo controle, observado nas figuras 24, 25 e 26. A outra concentração de Hmc364-382 e as concentrações testadas de Hmc666-678.

**Figura 24.** Análise de espécies reativas de oxigênio em epimastigotas tratados com Hmc666-678 e Hmc364-382 por citometria de fluxo.

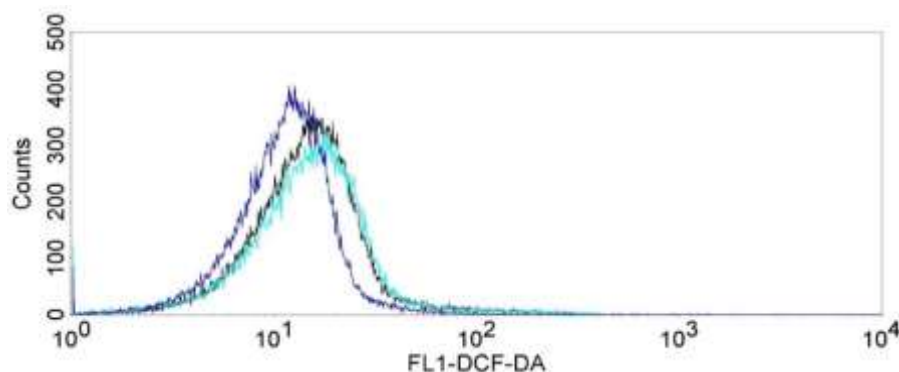


Legenda: Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* com tratamento nas concentrações com de 2,00  $\mu$ M e 4,01  $\mu$ M para Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39 $\mu$ M e 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 com e o por 24 horas. Os dados

foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  vs. grupo controle). 0: Controle (formas epimastigotas não tratadas). Azul escuro representa a  $IC_{50}$ , enquanto que o azul claro representa  $IC_{50/2}$ .

Fonte: elaborado pela autora.

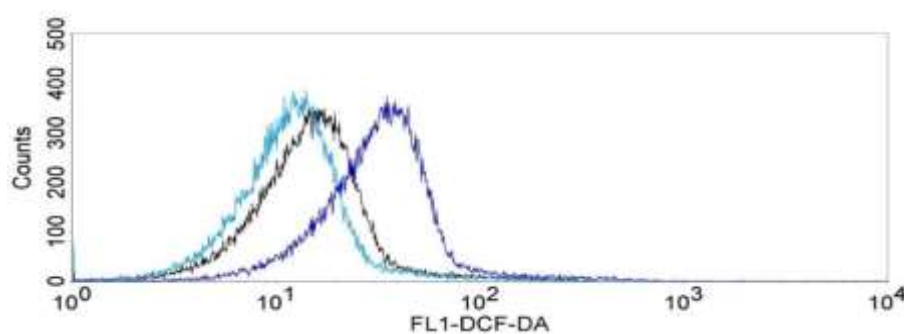
**Figura 25:** Histograma representativo do sinal fluorescente de DCF para Hmc666-678.



Legenda: O pico de cor preta representa o controle; O pico azul escuro representa a concentração de  $4,01\mu\text{M}$  e o pico azul claro representa a concentração de  $2,00\mu\text{M}$ .

Fonte: elaborado pela autora.

**Figura 26:** Histograma representativo do sinal fluorescente de DCF para Hmc364-382.



Legenda: O pico de cor preta representa o controle; O pico azul escuro representa a concentração de  $4,79\mu\text{M}$  e o pico azul claro representa a concentração de  $2,39\mu\text{M}$ .

Fonte: elaborado pela autora.

#### **5.4.5 Avaliação da morte celular por autofagia (marcação com laranja de acridina).**

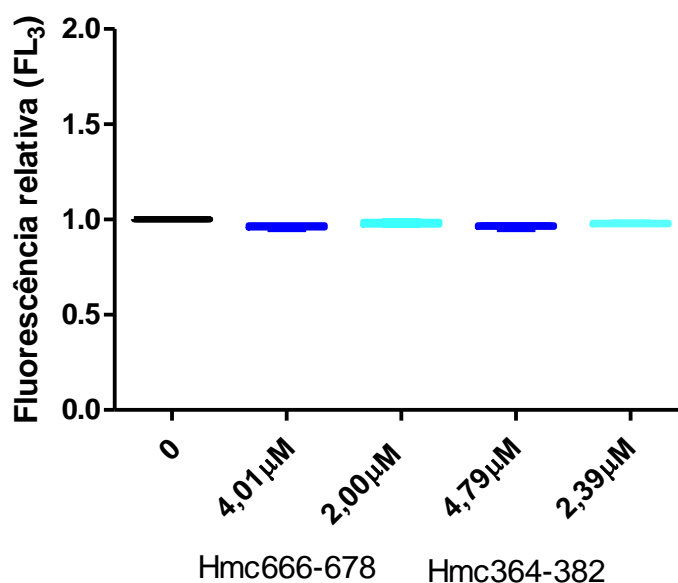
O processo autofágico induz a formação de fagossomos, que são



vesículas ácidas. Assim, pode-se utilizar o corante fluorogênico acidotrópico laranja de acridina para marcar especificamente esses ambientes celulares, onde o marcador se deposita.

Neste ensaio, as formas epimastigotas foram tratadas nas concentrações de 2,39 $\mu$ M e 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 e as concentrações de 2,00  $\mu$ M e 4,01  $\mu$ M para Hmc666-678 após 24 horas de incubação e marcadas com laranja de acridina. Os resultados não evidenciaram processo autofágico, como observados nas figuras 27, 28 e 29.

**Figura 27.** Fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com os peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382 marcadas com Laranja de Acridina.

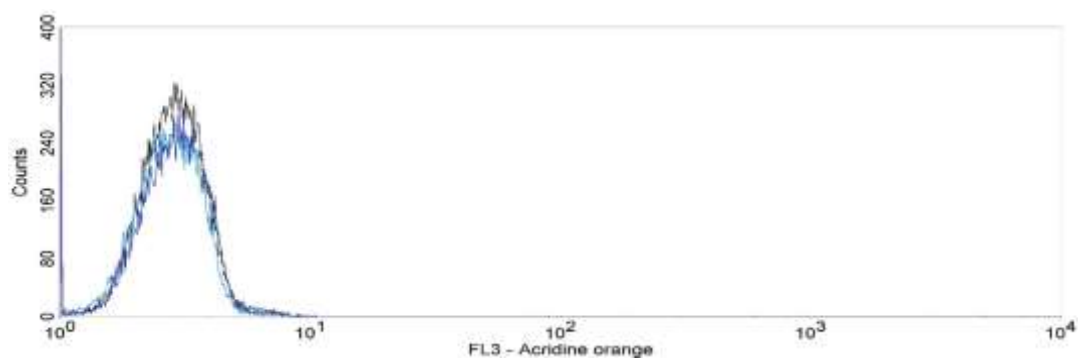


Legenda: Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* com tratamento nas concentrações com de 2,00  $\mu$ M e 4,01  $\mu$ M para Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39 $\mu$ M e 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 por 24 horas. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  vs. grupo controle). 0: Controle (formas epimastigotas não tratadas). Azul escuro representa a IC<sub>50</sub>, enquanto que o azul claro representa IC<sub>50/2</sub>.

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 28** – Histograma representativo do sinal fluorescente de laranja de

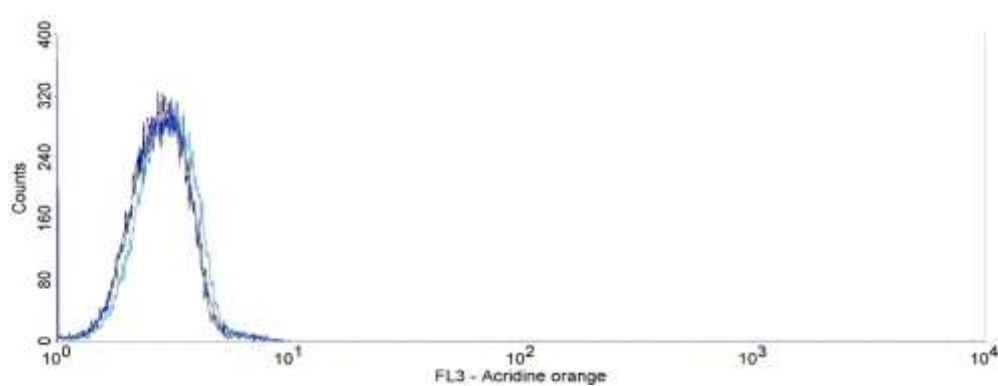
acridina do peptídeo Hmc 666-678.



Legenda: O pico de cor preta representa o controle; O pico azul escuro representa a concentração de 4,01 $\mu$ M e o pico azul claro representa a concentração de 2,00  $\mu$ M.

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 29:** Histograma representativo do sinal fluorescente de laranja de acridina do peptídeo Hmc364-382



Legenda: O pico de cor preta representa o controle; O pico azul escuro representa a concentração de 4,79 $\mu$ M e o pico azul claro representa a concentração de 2,39  $\mu$ M.

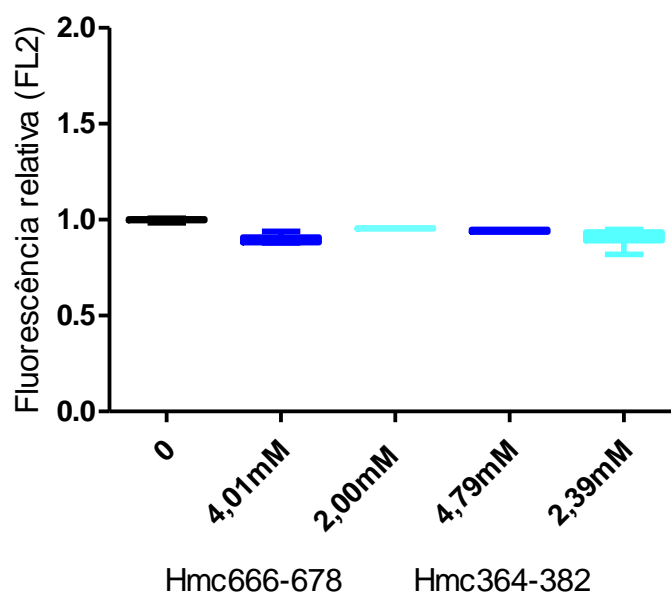
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 5.4.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Nesse ensaio, o parasito na sua forma epimastigota foi incubado com rodamina 123 (Rho 123), corante fluorescente específico que se acumula no espaço intermembrana mitocondrial de células viáveis. Dano no potencial transmembrânico mitocondrial causa redução do acúmulo de Rho123.

As formas epimastigotas do parasito foram tratadas nas concentrações de 2,39 $\mu$ M e 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 e as concentrações de 2,00  $\mu$ M e 4,01  $\mu$ M para Hmc666-678 após 24 horas de incubação e marcador com rodamina123. Os resultados não evidenciaram dano mitocondrial, como observados nas figuras 30, 31 e 32.

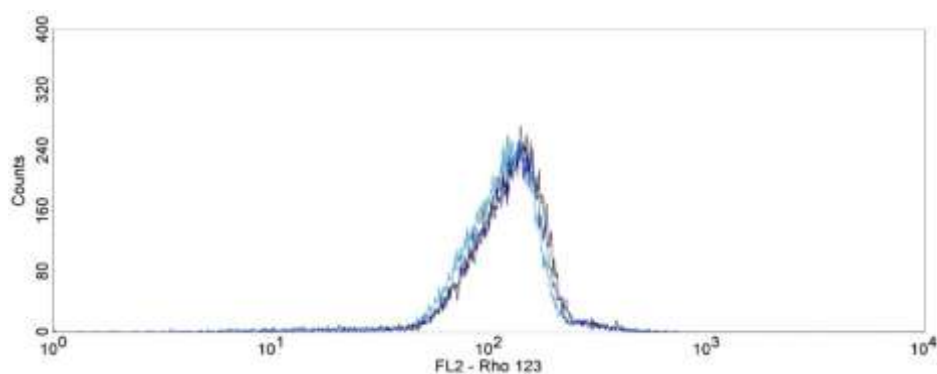
**Figura 30:** Análise do  $\Delta\Psi_m$  de epimastigotas tratados com com os peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382.



Legenda: Valores de fluorescência relativa de formas epimastigotas de *T. cruzi* com tratamento nas concentrações com de 2,00  $\mu$ M e 4,01  $\mu$ M para Hmc666-678 e nas concentrações de 2,39 $\mu$ M e 4,79 $\mu$ M para Hmc364-382 por 24 horas. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência  $\pm$  erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  vs. grupo controle). 0: Controle (formas epimastigotas não tratadas). Azul escuro representa a  $IC_{50}$ , enquanto que o azul claro representa  $IC_{50/2}$ .

Fonte: Elaborado pela autora.

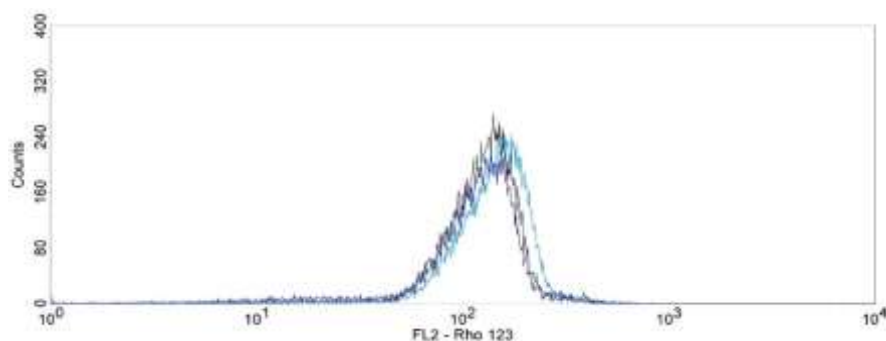
**Figura 31:** Histograma de intensidade de marcação com Rho123 gerada pelo peptídeo Hmc666-679.



Legenda: Rho123 = Rodamina 123. O pico de cor preta representa o controle; O pico azul escuro representa a concentração de 4,01 $\mu$ M e o pico azul claro representa a concentração de 2,00  $\mu$ M.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 32:** Histograma de intensidade de marcação com Rho123 gerada pelo peptídeo Hmc364-382.



Legenda: Rho123 = Rodamina 123. O pico de cor preta representa o controle; O pico azul escuro representa a concentração de 4,79 $\mu$ M e o pico azul claro representa a concentração de 2,39  $\mu$ M.

Fonte: Elaborado pela autora.

# Discussão

---

## 6. DISCUSSÃO

A DC é um grave problema de saúde pública e um dos principais problemas médico-sociais brasileiro, sendo considerada na América Latina a quarta doença infecciosa parasitária com maior impacto social (GRASCON *et al.*, 2014). O fluxo migratório de diferentes populações fez com que ocorresse um número crescente de casos em outros territórios como no EUA e em diversos países europeus (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2012; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2015). Assim a DC se caracteriza como um problema de saúde global sendo responsável por um gasto de US\$ 7,19 bilhões por ano (LEE *et al.*, 2013).

A necessidade da descoberta de novos fármacos contra *T. cruzi* é notável, uma vez que o arsenal terapêutico disponível para tratar a D.C é restrito, e o medicamento disponível para o tratamento possui muitas desvantagens. No Brasil o tratamento da DC se resume na utilização terapêutica específica, com o benzonidazol, e sintomática, para atenuação dos sintomas existentes (DIAS *et al.*, 2001). Produtos de origem animal, como peptídeos oriundos de animais marinhos já foram utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos, como o ziconotida, um agente analgésico derivado de um peptídeo pertencente ao caramujo cônico (SK, 2015).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) de origem animal vem sendo amplamente pesquisados na busca de novos modelos antichagasicos a vários anos (MCGWIRE; KULKARNI, 2010). PAMs apresentam inúmeras vantagens no que diz respeito à aplicação terapêutica, incluindo amplo espectro antimicrobiano, início de ação rápido e baixa possibilidade de resistência por parte dos micro-organismos (SEO *et al.*, 2012). Relatos na literatura apontam uma variedade de ações de PAM além da antibacteriana, como combate à células tumorais (CRACK *et al.*, 2012), ações contra vírus (UPLERTLOP *et al.*, 2011), fungos (CAVALCANTE *et al.*, 2016) e protozoários (LIMA *et al.*, 2016; MELLO *et al.*, 2017). Essas atividades biológicas não são excludentes entre si. Assim sendo, um PAM pode desempenhar mais de uma ação biológica aumentando ainda mais a viabilidade terapêutica desses peptídeos (GUO *et al.*, 2013).

De acordo com o programa computacional AMPA, foram obtidas sequências primárias de peptídeos com potencial antimicrobiano derivados da hemocianina do camarão *P. monodon*. A atividade antimicrobiana da hemocianina de muitos invertebrados marinhos vem sendo descrita, entre eles moluscos, peixes e camarões (SHESHADRI et al., 2012), o que tornou o estudo destes fragmentos peptídicos atraentes como objeto de estudo. Nesse contexto, o presente trabalho investigou a ação antichagásica em diferentes formas evolutivas (epimastigota, tripomastigota e amastigota) da cepa Y de *T. cruzi*, uma vez que esta cepa apresenta resistência ao benzonidazol, permitindo uma melhor investigação de substâncias tripanocida bioativas (CHERKESOVA et al., 2014).

Foram estudados quatro fragmentos da hemocianina, que foram nomeados a partir do intervalo da sequência de aminoácidos correspondentes. O Hmc185-197 e o Hmc666-678 com 13 resíduos cada, Hmc364-382 com 19 resíduos e Hmc476-498 com 23 resíduos foram sintetizados para os testes.

Inicialmente foi avaliado a citotoxicidade dos quatro peptídeos sobre as células LLC-MK2, que foram as células hospedeiras de *T. cruzi*. Depois de observadas quais as concentrações tóxicas, foi iniciada a busca do efeito antichagásico, apenas concentrações não tóxicas as células LLC-MK2. Estes peptídeos mostraram efeito concentração dependente até determinado aumento de concentração, e depois não ocorreu melhora em efeito. Todos mostraram perfil semelhante de inibição do crescimento.

O peptídeo Hmc364-382, único que possui estrutura secundária apenas constituído de  $\alpha$ -hélice foi o mais efetivo, apresentando menor IC<sub>50</sub> em formas tripomastigota e o maior índice de seletividade. Isto pode sugerir que dentre outras características, a conformação  $\alpha$ -hélice proporciona um maior potencial contra *T. cruzi*. Peptídeos antimicrobianos de conformação  $\alpha$ -hélice também já foram descritos como efetivos contra cepa Y de *T. cruzi*, como sDq-3348 e sDq-2561 (LIMA et al., 2018).

Dentre os peptídeos em estudo, os com valores mais elevados de IC<sub>50</sub> (Hmc476-498 e Hmc185-197), ou seja, os menos interessantes neste trabalho, possuem os menores valores de hidrofobicidade e momento hidrofóbico, apesar de possuírem os maiores valores de cargas líquidas. No entanto para os peptídeos com menores valores de IC<sub>50</sub> (Hmc364-382 e Hmc666-678)

apresentam as menores cargas líquidas e os maiores valores de hidrofobicidade e momento hidrofóbico. As três propriedades físico-químicas são importantes uma vez que a membrana parasitária é carregada negativamente e constituída de lipídeos, porém o presente trabalho indica que para os peptídeos estudados a hidrofobicidade e o momento hidrofóbico estão mais relacionados a morte de *T. cruzi*, permitindo a interação dos peptídeos com as membranas celulares dos parasitos. Além disso De acordo com Wieprecht *et al.* (1997), um aumento de  $\mu\text{H}$  de um peptídeo, mantendo todos outros parâmetros físico-químicos constantes, potencializa consideravelmente sua permeabilização em vesículas constituídas lipídicas, o que é atribuído a um aumento da afinidade do peptídeo para a membrana.

A atração eletrostática dos peptídeos pela membrana negativamente carregada do *T. cruzi* também já foi relacionada com cargas líquidas positivas (LIMA *et al.*, 2018). Neste trabalho os peptídeos mais ativos mostraram as cargas líquidas mais baixas, porém apresentaram alta hidrofobicidade e momento hidrofóbico, características que mostram potencial de interação com membranas. Estes peptídeos possuem um perfil de inibição diferente, onde a morte total não foi evidenciada, sugerindo que ocorre interação com a membrana, mas a ligação não é forte o suficiente para levar a morte de 100% dos parasitos, o que pode ser ocasionado por uma baixa carga líquida presente nos mesmos, tornando a atração pela membrana do parasita menor.

As  $\text{IC}_{50}$  obtidas quando comparadas com as do benzonidazol descrito por LIMA (2018) para a forma epimastigota chegam a ser 50 vezes menores para Hmc364-382 e Hmc666-678 e 6 vezes menores para Hmc476-498 e Hmc185-197 nas primeiras 24 horas de tratamento, enquanto que para a forma evolutiva tripomastigota, responsável pela infecção do hospedeiro a  $\text{IC}_{50}$  foi de pelo menos 64 vezes menor para os peptídeos Hmc666-678 e Hmc364-382 e para Hmc476-498 e para Hmc185-197 2 vezes menores que a  $\text{IC}_{50}$  do benzonidazol.

Os peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382 mostraram concentrações de  $\text{IC}_{50}$  semelhante nas formas epimastigotas com nas tripomastigotas, porém os peptídeos Hmc476-498 e Hmc185-197 apresentaram efeito melhor sobre os epimastigotas, sendo observado efeito sobre os tripomastigotas apenas nas concentrações que foram tóxicas as células hospedeiras (LLC-MK2).



Dentre os peptídeos antimicrobianos derivados da *D. quadriceps* (sDq-2561; sDq-1503; sDq-3348 e sDq-1319) foi visto atividade antichagásiga de todos contra as formas evolutivas tripomastigotas, enquanto não foi encontrado efeito de sDq-1319 sobre a forma evolutiva epimastigota (LIMA *et al.*, 2018). Em relação aos derivados do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34]) foi observado ação sobre a forma evolutiva epimastigota apenas para o Ctn, peptídeo com maior número de aminoácidos, enquanto que para a forma evolutiva tripomastigota foi encontrado efeito para todos os derivados testados (BANDEIRA *et al.*, 2017) e para o derivado da *Bothrops atrox* (BatxC) foi encontrado efeito contra ambas formas evolutivas (MELLO *et al.*, 2017). No presente estudo foi encontrada ação contra as formas evolutivas epimastigota e tripomastigota dos quatro (Hmc185-197, Hmc666-678, Hmc364-382 e Hmc476-498) peptídeos derivados da hemocianina do camarão *P. monodon*.

Para que uma substância seja considerada promissora como fármaco é importante que ele apresente seletividade sobre as células-alvo, sem lesão celular expressiva sobre as células do hospedeiro (PEÑA; SCARONE; SERRA, 2015). Além da necessidade de um índice de seletividade alto, também necessário efeito contra as formas amastigotas, uma vez que são as formas responsáveis pela manutenção da infecção (MORILLA; ROMERO, 2015). A resistência ao tratamento tem sido reportada em outros estudos como um resultado da dificuldade de certas drogas atravessarem a membrana da célula infectada e obter o acesso ao parasita dentro do vacúolo parasitóforo (BORGES *et al.*, 2012). O principal exemplo dessa limitação é o próprio benzonidazol que possui baixa permeação através da membrana plasmática, sendo necessário um enorme gradiente de concentração para obter acesso aos amastigotas citoplasmáticos (MORILLA; ROMERO, 2015). Portanto, o desafio terapêutico na DC baseia-se principalmente na identificação de substâncias que apresentem eficácia contra as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, assim como foi encontrado nos dois derivados da hemocianina selecionados demonstraram.

Os dois peptídeos (Hmc364-382 e Hmc666-678) possuindo os maiores índices de seletividade 55,24 e 45,35 respectivamente foram testados contra formas amastigotas, demonstrando efeito no parâmetro de número de amastigotas por 100 células. Três diferentes concentrações foram testadas e não

foi observado diferenças estatísticas entre elas, sugerindo um efeito não concentração dependente. Também foi avaliado o percentual de células infectadas, porém este parâmetro não foi afetado pelas concentrações testadas dos peptídeos. Estes dados corroboram com os achados nos testes realizados contra tripomastigotas e epimastigotas, ou seja, mesmo em menores concentrações também exibem uma inibição significativa do *T. cruzi*.

Pelas diretrizes da OMS/TDR, para um candidato antichagásico ser considerado um sucesso é necessário índice de seletividade acima de 50 (NWAKA; HUDSON, 2006). Dos quatro peptídeos testados, apenas um demonstrou índice de seletividade acima de 50 (Hmc364-382), contudo por ambos os peptídeos (Hmc364-382 e Hmc-666-678) terem apresentado bons resultados de inibição da forma amastigota, estes foram utilizados nos testes posteriores para a elucidação do mecanismo de ação.

Para a investigação sobre o tipo de morte celular foram realizados ensaios que analisam fatores morfológicos e bioquímicos (VANDEN BERGUE *et al.*, 2013). Para fatores morfológicos e ultraestruturais foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, e para fatores bioquímicos citometria de fluxo utilizando marcadores específicos. A forma eleita para avaliação do mecanismo de ação foi a epimastigota pela facilidade de manutenção em culturas e por ser proliferativa, bem como a amastigota (GIRARD *et al.*, 2016; SOUZA, 2002).

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), realizada com 12 horas de tratamento, foi observado para o ambos os peptídeos o aumento dos reservossomos, em especial para o Hmc364-382 foi também observado o aumento em número dessa estrutura, esse achado é sugestivo de um processo de morte celular autofágico, já que o aumento das vesículas ácidas pode estar relacionado a este mecanismo de morte celular (KESSLER *et al.*, 2013). Enquanto para o peptídeo Hmc666-678 foi observado também uma diminuição do tamanho da estrutura celular do parasito e uma desorganização intracelular. Nas imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura realizado com 24 horas de tratamento independente das concentrações testadas foi encontrado a formação de poros na membrana celular e diminuição do tamanho e inchaço das formas epimastigotas, o que pode ser indicativo de morte celular tanto por apoptose, necrose ou ainda por necrose secundária.

Por meio da citometria de fluxo realizada com 24 horas de tratamento foi observado a existência de necrose celular pela marcação de 7AAD e apoptose tardia ou necrose secundária pela dupla marcação com 7AAD e anexina para ambos os peptídeos e nas duas concentrações testadas. A dupla marcação com 7AAD e anexina pode ocorrer muitas vezes, pois a célula em processo de necrose permite a marcação com fosfatidilserina uma vez que neste processo de morte celular ocorre a ruptura celular e perda da integridade da membrana.

A não marcação com rodamina representa que a morte celular não gera danos mitocondriais

A não marcação com laranja de acridina, no tempo de 24 horas de tratamento um dos marcadores sugestivos de processo autofágico, pode indicar que o mecanismo de ação inicia por autofagia como observado no MET, em 12 horas de tratamento, e evolui para outros mecanismos, já que quando o estresse celular continua, a morte celular pode continuar pela autofagia sozinha, ou freqüentemente se torna associada a características de morte celular apoptótica ou necrótica (MAIURI, 2007). Para a avaliação de mecanismo autofágico, existem marcadores bioquímicos mais específicos que o laranja de acridina, como a deslocalização de GFP-LC3 para os autofagossomos ou a lipidação de LC3, como detectado por deslocamento de banda em western blots (TANIDA, 2011), que não foram testados neste estudo.

Hmc364-382 gerou dupla marcação por 7AAD e anexina predominante em ambas as concentrações testadas e a liberação de espécies reativas de oxigênio (aumento da fluorescência de DCF) na concentração de IC<sub>50</sub>, resultados que quando observados junto ao do MET (indicativo de autofagia) e MEV (indicativo de necrose/apoptose) nos sugere uma morte celular iniciada por autofagia, ocorrendo a evolução para uma necrose apoptose tardia ou necrose secundária. Enquanto para o peptídeo Hmc666-678 por meio da citometria e do MEV é observado uma morte celular predominante por necrose, porém não ocorre o envolvimento de espécies reativas de oxigênio.

Vem sido demonstrado prioritariamente a necrose como via da morte celular do benzonidazol (BANDEIRA *et al.*, 2017) e de outros PAMs derivados de animais, incluindo batroxidina (MELLO *et al.*, 2017) e crotalidina (BANDEIRA *et al.*, 2017), mas diferentes mecanismos, como a apoptose e

autofagia, no caso da melitina de veneno de abelha contra *T. cruzi* (ADADE *et al.*, 2013). A autofagia e apoptose também são evidenciadas como mecanismo de morte em outros parasitos como contra o *Trypanosoma brucei* induzida por bacteriocina AS-48 (MARTÍNEZ-GARCÍA *et al.*, 2018) e por neuropeptídeos (DELGADO, 2009) e contra *Leishmania donovani* induzida pela temporina-SHa (RAJA *et al.*, 2017).

Apesar de outros PAMs derivados de animais descritos pelo nosso grupo de estudo possuírem um perfil de inibição mais potente nas formas evolutivas de *T. cruzi* (LIMA *et al.*, 2018; MELLO *et al.*, 2017; BANDEIRA *et al.*, 2017), os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-689 possuem vantagem de serem moléculas não serem derivadas de venenos animais, podendo existir menor risco de toxicidade e efeitos colaterais *in vivo*.

Assim, os peptídeos Hmc364-382 e Hmc666-678 demonstram potencial como modelo para o desenvolvimento de novos medicamentos ou adjuvantes para o arsenal quimioterapêutico e estratégias clínicas para tratar a D.C.

# Conclusão

---

## 7. CONCLUSÃO

Os peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382, Hmc185-197 e Hmc476-498 derivados da hemocianina do *P. monodon* mostraram efeito antichagásico contra as formas epimastigota e tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi*.

Os peptídeos Hmc666-678, Hmc364-382 foram os mais promissores, apresentando alto índice de seletividade e efeito contra a forma amastigota da cepa Y de *T. cruzi*.

As alterações morfológicas e bioquímicas causadas por esses dois peptídeos mais promissores na forma epimastigota, mostraram indícios de morte por autofagia, necrose e /ou apoptose tardia.

# Referências

---

## 8. REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M. et al. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.
- ADADE, C.M., CONS, B.L., MELO, P.A., SOUTO-PADRÓN, T., Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol** n.138, p. 46-58, 2011.
- ADACHI K, Wakamatsu K, Ito S, N Miyamoto, Kokubo T, Nishioka T, et al. (2005) Uma hemocianina transportadora de oxigênio pode atuar na via tardia da síntese de melanina. **Pigm Cell Res** 18: 214-219.
- ALMEIDA, C.; ADADE, Camila Marques; SOUTO-PADRÓN, Thaïs. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, 2010
- AFONSO, Anna M.; EBELL, Mark H.; TARLETON, Rick L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1881, 2012.
- ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi* : Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 44–52, 2007.
- ANDREWS, N.; COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J Protozool.**, v. 29, n. 2, p. 264–269, 1982.
- ANDRADE, Daniela V.; GOLLOB, Kenneth J.; DUTRA, Walderez O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.
- AYO, Christiane Maria et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 195–206, 2012.
- BACHÈRE, Evelyne. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 3-11, 2000.
- BANDEIRA, I.C.J. et al. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. **Parasitology**, 2017.



BARRETO ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RAA, Barata RB, Rodrigues LC. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**. 2011 May;377(9780):1877-89.

BARBERATO FILHO, Silvio. **Pesquisa e desenvolvimento de fármacos no Brasil: estratégias de fomento**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões. **Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil**, 2007.

BEARD CB, Pye G, Steurer FJ, Rodriguez R, Campman R, Peterson AT, Ramsey J, Wirtz RA, Robinson LE (2003) Chagas disease in a domestic transmission cycle in southern Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases* 9:103–105.

BECHINGER, B. (2015). The SMART model: Soft Membranes Adapt and Respond, also Transiently, in the presence of antimicrobial peptides. *Journal of Peptide Science*, 21(5), 346–355.

BERA, Ananya et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.

BESTETTI, Reinaldo B.; RESTINI, Carolina Baraldi A. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. **International journal of cardiology**, v. 176, n. 2, p. 309-314, 2014.

BERN, Caryn; MONTGOMERY, Susan P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 5, p. e52-e54, 2009.

BIOLO, Andréia; RIBEIRO, Antonio L.; CLAUSELL, Nadine. Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years?. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 52, n. 4, p. 300-316, 2010.

BONNEY, Kevin M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite (Paris, France)*, v. 21, p. 11, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626257>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

CASTRO, D. P. et al. Trypanosoma cruzi : Ultrastructural studies of adhesion , lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Experimental Parasitology* v. 117, p. 201–207, 2007.

CECILIO, A. B. et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A2 from snake venom and their antiviral activities against

Dengue virus. **Toxins**, v. 5, p. 1780– 1798, 2013.

CHAGAS, Carlos. *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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1909. [S.l:s.n.].

Disponível em:[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761909000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008).

CHATELAIN, Eric. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 15, p. 98–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>>.

CLAYTON, Julie. Doença de Chagas 101. **Nature** , v. 465, n. n7301\_suppl, p. S4-S5, 2010.

COATES CJ, Nairn J (2014) Diversas funções imunológicas das hemocianinas. *Dev Comp Immunol* 45: 43-55. pmid: 24486681

COELHO, P. A.; SANTOS, M. C. F.; RAMOS-PORTO, M. Ocorrência de *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, no litoral dos estados de Pernambuco e Alagoas (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Boletim Técnico Científico do Cepene**, Tamandaré, v. 9, n. 1, p.

COLE, Alexander M; LEHRER, Robert I. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. *Current pharmaceutical design*, v. 9, n. 18, p. 1463–73, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769726>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

COSTA, M. et al. Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Biological Sciences**, 2011.

COSTA, E. G. et al. Acute Chagas Disease in the Brazilian Amazon: Epidemiological and clinical features. **International Journal of Cardiology**, p. 8–10, 2017.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease: what is known and what is needed-- a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102 Suppl, n. August, p. 113–122, 2007.

COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. n7301\_suppl, p. S6–S7, 24 jun. 2010.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J.; SNADER, Kenneth M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of natural products**, v.

60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CHERKESOVA, T. S. et al. Sequence variation in CYP51A from the y strain of 124 *Trypanosoma cruzi* alters its sensitivity to inhibition. **FEBS Letters**, v. 588, n. 21, p. 3878–3885, 2014.

CUNHA-NETO, Edecio et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 252-258, 2009.

CUSHMAN, David W.; ONDETTI, Miguel A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine*, v. 5, n. 10, p. 1110–1112, 1 out. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502801>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

DE ANDRADE, A. R. Aplicação da citometria de fluxo para otimização do método de determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante em bio-manguinhos / fiocruz. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

DELGADO, M. et al. Os neuropeptídeos matam os tripanossomas africanos, visando os compartimentos intracelulares e induzindo a morte celular autofágica. **Morte e diferenciação celular**, v. 16, n. 3, p. 406, 2009.

DE SOUZA, E. M. et al. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*, v. 127, n. 2, p. 429–35, 2011.

DESTOUMIEUX-GARZÓN D, Saulnier D, J Garnier, Jouffrey C, Buli P, Bachère E (2001) Imunidade a crustáceos: os péptidos antifúngicos são gerados a partir do terminal C da hemocianina do camarão em resposta ao desafio microbiano. *J Biol Chem* 276: 47070-47077. pmid: 11598107.

DIAS, J. C. P.; MACHADO, E. M. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v16, p13-34, 2000.

DIAS JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jul;97(5):603-12.

DOLASHKA, Pavlina et al. Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from *Helix* and *Rapana* snails. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 263-270, 2016

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. In: **Federation Proceedings**. 1986. p. 2471-2476.

DRIN, Guillaume; ANTONNY, Bruno. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS letters*, v. 584, n. 9, p. 1840–7, 3 maio 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.10.022>>.

DUTRA, Walderez Ornelas et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208-218, 2009.

EISENBERG, D; WEISS, R M; TERWILLIGER, T C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, v. 299, n. 5881, p. 371–4, 23 set. 1982

FERREIRA, S H. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF BOTHROPS JARARCA. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, v. 24, p. 163–9, fev. 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14302350>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

FINDLAY, B., Zhanel, G. G. & Schweizer, F. Cationic Amphiphiles, a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4049–4058.2010

FRANCISCO, Amanda F *et al.* Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology*, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, 23 dez. 2017. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182017001469/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182017001469/type/journal_article)>. Acesso em: 24 jan. 2018.

Gascon, J. R. Vilasanjuan, A. Lucas **A necessidade de colaboração global para enfrentar a crise oculta de saúde pública da doença de Chagas** Perito Rev. Anti Infect. Ther. , 12 ( 4 ) ( 2014 ) , pp. 393 – 395.

GUILHELMELLI, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *frontiers in Microbiology*, 4, Article 353.

HARVEY, Alan L. Toxins and drug discovery. *Toxicon*, v. 92, p. 193–200, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.020>>.

HASHIM, D. *et al.* The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 5, p. 926–933, maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26802157>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas ' disease. *Antimicrob Chemother*, v.67, p. 1261–1266, 2012.

HOLMBLAD, T. y Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172: 111–123.

JENSSEN, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.

JOY, Scott V; RODGERS, Philip T; SCATES, Ann C. Incretin Mimetics as Emerging Treatments for Type 2 Diabetes. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 39, n. 1, p. 110–118, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15562141>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

KELECOM A, Laneuville Teixeira V (1986) Diterpenes of marine brown algae of the family Dictyotaceae: their possible role as defense compounds and their use in chemotaxonomy. *Sci Total Environ* 58:109–115.

KESSLER, R. L. et al. Trypanosoma cruzi Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

KULKARNI, M. M. et al. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous Leishmania infection. *Cellular microbiology*, v. 13, n. 6, p. 913–923, jun. 2011.

LAHLOU, Mouhssen. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacol Pharm**, v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.

LANA, M. DE; TAFURI, W. L. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. et al. (Eds.). **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 85–108.

LI, Jesse W.-H.; VEDERAS, John C. Descoberta de medicamentos e produtos naturais: fim de uma era ou uma fronteira sem fim?. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, Trypanosoma cruzi, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *New biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 837–843, 2010.

LIMA, Dânya Bandeira et al. The dinoponeratoxin peptides from the giant ant Dinoponera quadriceps display in vitro antitrypanosomal activity. **Biological chemistry**, v. 399, n. 2, p. 187-196, 2018.

LUQUEORTEGAS. Martínez, J.M. Saugar, L.R. Izquierdo, T. Abad, J.G.Luis, J. Piñero, B. Valladares, L. Rivas **Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenylphenalenone phytoalexins from the banana plant (Musa acuminata) target mitochondria of Leishmania donovani promastigotes** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (5) (2008), pp. 1534-1540.

LEE, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M. I. (2016). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39.

LINDEQUIST U. Farmacêutica Derivada Marítima - Desafios e Oportunidades. *Biomol. Ther.* 2016; 24 : 561-571 doi: 10.4062 / biomolther.2016.181.

MARTINS, A. V. et al. Biology of *Trypanosoma cruzi* : An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, p. 45–58, 2012.

MAIURI, M.C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 8:741- 752 (2007).

MARTÍNEZ-GARCÍA, Marta et al. Autophagic-related cell death of *Trypanosoma brucei* induced by bacteriocin AS-48. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 203-212, 2018.

MCGWIRE, Bradford S.; KULKARNI, Manjusha M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 397-405, 2010.

MALANOVIC, N., Lohner, K., & Hilpert, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(5), 936–946.

MACHADO, Fabiana S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2012. p. 753-770.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 146, p. 601–620, 2007.

MORILLA, Maria Jose; ROMERO, Eder Lilia. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine*, v. 10, n. 3, p. 465–481, 24 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm.14.185>>. Acesso em: 2 set. 2017.

MORILLO, Carlos A *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295–306, out. 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1507574>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

MOWERY, B. P. et al. Mimicry of Antimicrobial Host-Defense Peptides by Random Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15474–15476 (2007).

MELLO, Clarissa Perdigão *et al.* Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 130, p. 56–62, maio 2017b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010117300776>>. Acesso em: 6 dez. 2017.

MCDOWELL, Gladstone C; POPE, Jason E; POPE, Jason E. Intrathecal Ziconotide: Dosing and Administration Strategies in Patients With Refractory Chronic Pain. **Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society**, v. 19, n. 5, p. 522–32, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26856969>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

MENNA-BARRETO, Rubem F.S. *et al.* Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, 2009.

MENEZES, R.R.P.P. Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 *in vitro*. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology, Lawrence**, v. 56, n. 3, p. 208-213, 2009.

MUÑOZ-SARAIVA, S. G. *et al.* Chronic Chagas ' heart disease : a disease on its way to becoming a worldwide health problem : epidemiology , etiopathology , treatment , pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Fail**, v. 17, p. 45–64, 2012.

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

NWAKA, S. and Hudson, A. (2006). Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nat. Rev. Drug Discov.** 5, 941–955.

NÓBREGA AA, Araújo WN, Vasconcelos AM. Mortality due to Chagas disease in Brazil according to a specific cause. **Am J Trop Med Hyg.** 2014 Sep;91(3):528-33

NOGUEIRA, A. J. M. *et al.* Síntese, caracterização e estudo da atividade inibitória de novas dialquilfosforilimidrazonas sobre o crescimento de tripanossomatídeos. **QUIM. NOVA**, v. 34, n. 8, p. 1365–1369, 2011.

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil.

Revista de Patologia Tropical, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.

PANDEY, Ramesh C. Prospecção de novos fármacos potencialmente a partir de fontes naturais. **Revisões de pesquisa medicinal**, v. 18, n. 5, p. 333-346, 1998.

PÉREZ-AYALA, A. . et al. Chagas disease in Latin American migrants : a Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect*, v. 17, p. 1108–1113, 2011.

PEÑA, S.; SCARONE, L.; SERRA, G. Macrocycles as potential therapeutic agents in neglected diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 355–382, 2015.

POPE, Jason E; DEER, Timothy R. Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 14, n. 7, p. 957–966, 28 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537340>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

PAUL RJ, Pirow R (1998) O significado fisiológico das proteínas respiratórias em invertebrados. *Zoology* 100: 298-306.

Pesquisa do G-Finder 2013, 2013 Pesquisa do G-Finder, 2013. Relatório disponível em [http://www.policycures.org/downloads/GF\\_report13\\_all\\_web.pdf](http://www.policycures.org/downloads/GF_report13_all_web.pdf) .

QIN, Zhendong et al. Antibacterial activity of hemocyanin from red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Fish & shellfish immunology**, v. 75, p. 391-399, 2018.

QIAO J, ZH Du, Zhang YL, Du H, Guo LL, Zheng MQ, et al. (2011) Identificação proteômica das proteínas imuno-estimulantes relacionadas ao camarão *Litopenaeus vannamei* estimuladas com vitamina C e ervas chinesas. **Peixe Marisco Immunol** 31: 736-745. pmid: 21767650

RAJA, Zahid et al. Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174024, 2017.

RAVICHANDRAN, S., Jeyalakshmi, S., Sudha, S., Anbuhezian, R. Antimicrobial peptides from the hemolymph of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Bangladesh J Pharmacol** 2010, 5, 62–67.

RASSI, Anis; DE REZENDE, Joffre Marcondes. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.

RESENDE, J. M.; Moraes, C. M.; Prates, M. V.; Cesar, A.; Almeida, F. C. L.; Mundim, N.; Valente, A. P.; Bemquerer, M. P.; Piló-Veloso, D. e Bechinger, B. (2008). "Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1,-2,



and-3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations". **Peptides**, v.29, n.10, p.1633-1644

RIBEIRO, C. M. Efeito do Tratamento do Benzonidazol e da Terapia Antioxidante na Cardiopatia Chagásica Crônica. [s.l.] **Universidade de Santa Catarina**, 2009.

RIBEIRO, T. G. et al. Novel targeting using nanoparticles: An approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 877–890, 2014.

Rodrigues, J.H., Ueda-Nakamura, T., Correa, A.G., Sangi, D.P., and Nakamura, C.V. (2014). A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benzni-dazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One** 9, e85706.

RUSAINI, Owens L. Suppression Subtractive Hybridization in Penaeid Prawns: An Approach in Identifying Diseases and Differentially Expressed Genes. **J Aquac Mar Biol**, v. 7, n. 1, p. 00177, 2018.

SATO, H., & Feix, J. B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1758(9), 1245–1256.

SK KIM (Ed.). Springer Manual de Biotecnologia Marinha, **Springer** (2015), pp.1-8

SESTI-COSTA, R. et al. Ruthenium Complex with Benznidazole and Nitric Oxide as a New Candidate for the Treatment of Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

SILVA, C. F. et al. Cellular Effects of Reversed Amidines on *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 51, n. 11, p. 3803–3809, 2007.

SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. v. 2010, 2010.

SOUZA, W. DE. O Parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Eds.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88–126.

SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. Suppl. 1, p. 89–100, 2009.

SUN, Yen; SUN, Tzu-Lin; HUANG, Huey W. Mode of Action of Antimicrobial Peptides on *E. coli* Spheroplasts. *Biophysical journal*, v. 111, n. 1, p. 132–9, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349516303629>>. Acesso em:

23 jan. 2018.

Tanida I.: Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 14: 2201-2214.

TEIXEIRA, Vitor; FEIO, Maria J.; BASTOS, Margarida. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, v. 51, n. 2, p. 149–177, abr. 2012.

TIWARI, Pragma. Recent Trends in Therapeutic Approaches for Diabetes Management: A Comprehensive Update. *Journal of diabetes research*, v. 2015, p. 340838, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26273667>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

THEOPOLD, Ulrich et al. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in immunology*, v. 25, n. 6, p. 289-294, 2004.

TORRENT, Marc *et al.* Ribonucleases as a host-defence family: evidence of evolutionarily conserved antimicrobial activity at the N-terminus. *The Biochemical journal*, v. 456, n. 1, p. 99–108, 15 nov. 2013. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20130123>>. Acesso em: 1 fev. 2018

TOSO, A. M.; VIAL, F. U.; GALANTI, Norbel. Oral transmission of Chagas' disease. *Revista médica de Chile*, v. 139, n. 2, p. 258-266, 2011.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease : controversies and advances. v. 19, n. 11, p. 495–501, 2005.

UNCITI-BROCETA, J. D. et al. Specific Cell Targeting Therapy Bypasses Drug Resistance Mechanisms in African Trypanosomiasis. *PLOS Pathogens*, v. 11, n. 6, p. e1004942, 2015.

VAN HOLDE KE, Miller KI (1995) Hemocianinas. *Adv Protein Chem* 47: 1-81. pmid: 8561049

VIOTTI, R. VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas Disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 7, p. 157–163, 2009.

VIOTTI, R BA de Noya , T. Araújo-Jorge , MJ Grijalva , F. Guhl , *et al.* **Para uma mudança de paradigma no tratamento da doença de Chagas crônica** *Antimicrob. Agentes Chemother.* , 58 ( 2 ) ( 2014 ) , pp. 635 - 639

WILLKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr top med chem*, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). “Chagas disease (American trypanosomiasis)”. Fact sheet N° 340 Updated March 2016. **World Health**

**Organization, Geneva, Switzerland. 2016.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record** 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **WHO**, 2010.

WANG, C. K., King, G. J., Conibear, A. C., Ramos, M. C., Chaousis, S., Henriques, S. T., & Craik, D. J. (2016). Mirror Images of Antimicrobial Peptides Provide Reflections on Their Functions and Amyloidogenic Properties. *Journal of the American Chemical Society*, 138(17), 5706–5713.

WIEPRECHT, T et al. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS letters*, v. 417, n. 1, p. 135–40, 3 nov. 1997.

WHITE, D. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. (Oxford University Press, 2007).*

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). “Chagas disease (American trypanosomiasis)”. Fact sheet N° 340 Updated March 2016. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland. 2016.

YAVARI, Bahram *et al.* The potential use of peptides for cancer treatment. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, 11 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29332577>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 24 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807545>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

ZINGALES, B *et al.* Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the Trypanosoma cruzi genome project.

ZANJANI NT, Miranda-Saksena M, Valtchev P, Diefenbach RJ, Hueston L, Diefenbach E, et al. (2016) A hemocianina de abalone bloqueia a entrada do HSV-1 nas células: uma potencial nova estratégia antiviral. **Antimicrob Agents Chemother** 60: 1013–1012.

ZHANG YL, Wang SY, Peng XX (2004) Identificação de um tipo de proteína humana semelhante a IgG em camarão *Penaeus vannamei* por espectrometria de massa. **J Exp Mar Biol Ecol** 301: 39-54.

ZHANG YL, Wang SY, Xu, Chen J, Lin B, Peng XX (2006) Abordagem proteômica por afinidade para identificação de uma proteína semelhante a IgA em *Litopenaeus*.