



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

BRENNNA PINHEIRO SILVA

**EFEITO TRIPANOCIDA DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DAS
DINOPONERATOXINAS**

FORTALEZA

2021

BRENNNA PINHEIRO SILVA

EFEITO TRIPANOCIDA DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DAS
DINOOPONERATOXINAS

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

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

Coorientadora: Dra. Danya Bandeira Lima.

FORTALEZA

2021

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)

S578e Silva, Brenna Pinheiro.

Efeito tripanocida de peptídeos derivados das dinoponeratoxinas / Brenna Pinheiro Silva.
– 2021.

47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará,
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins Nunes.
Coorientação: Profa. Dra. Danya Bandeira Lima.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Dinoponeratoxinas. I. Título.

CDD 615

BRENNNA PINHEIRO SILVA

EFEITO TRIPANOCIDA DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DAS
DINOPONERATOXINAS

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dra. Márcia Machado Marinho
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus, por toda força e coragem. Aos meus pais e irmã, meus grandes incentivadores. E por fim, aos amigos queridos, por todo o apoio durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me feito entender e aceitar que tudo ocorre no tempo Dele.

Ao meu pai querido, Haroldo, por todo amor e carinho.

A minha mãe, Nilzete, minha inspiração constante.

A minha irmã, Bruna, por estar ao meu lado em todas as minhas decisões.

Ao meu amado Edmundo, por todos os lambeijos e arranhões.

A minha madrinha Decélis e meu irmão do coração Leonardo, por se fazerem presente em minha vida, me incentivando e apoiando.

A minha tia Vônia, por ter aberto as portas da sua casa e por ter me acolhido durante esses anos de graduação.

A Universidade Federal do Ceará e a todos os professores, funcionários e colaboradores do curso de Farmácia, por contribuírem com a minha formação profissional.

A querida professora Alice, por toda confiança depositada ao longo desses anos.

Aos professores Ramon e Tiago, pela amizade e parceria.

A Danya e Marília, que tornaram possível a realização desse trabalho.

A toda família LBFBC, e em especial a Márcia, Gdayllon, Louise, Gabriela, Erlânia, Nicole, Lyanna, Natália, Davi, Yasmim, Stephanie e Igor, pelos momentos de descontração e aprendizado.

Ao Emanuel, pela amizade que construímos ao longo desses anos e por todas as gaitadas, ameaças, planos de viagens e conselhos.

Aos amigos que fiz durante a graduação, em especial aos companheiros do #PAZ – Andréia, Carina, João, Marinara, Paloma, Pedro, Thaynara e Vinícius – que tornaram essa jornada mais leve.

E por fim, as minhas meninax, Amanda, Ivna e Thiago, por estarem ao meu lado em todos os momentos, iluminando meu caminho como verdadeiros girassóis.

“Deus nunca disse que a jornada seria
fácil, mas Ele disse que a chegada valeria
a pena.”

Max Lucado.

RESUMO

A doença de Chagas representa um importante problema de saúde pública e o benzonidazol, único fármaco utilizado no tratamento, apresenta eficácia limitada e provoca graves efeitos adversos. Nesse contexto, torna-se necessária a busca por estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade pelo parasito, diminuindo as complicações causadas no hospedeiro. O veneno da formiga gigante *Dinoponera quadriceps* é rico em peptídeos, denominados dinoponeratoxinas (DnTxs), cujos efeitos os tornam semelhantes a peptídeos antimicrobianos. A DnTx Dq-2561, em estudo recente, apresentou melhor efeito antichagásico, com alto índice de seletividade (IS) (80,3), sendo considerada a mais promissora, contudo mostrou-se hemolítica. Em vista disso, dois fragmentos da DnTx Dq-2561 foram projetados e sintetizados: Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15]. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial tripanocida dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y (cepa resistente ao benzonidazol). A toxicidade dos peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] foi avaliada em células hospedeiras LLC-MK2, pelo método de redução do MTT. O efeito tripanocida foi avaliado sobre as formas epimastigotas (cultivadas em meio LIT, a 28°C), tripomastigotas e amastigotas (obtidas através de infecção de células LLC-MK2 e cultivadas em meio DMEM, a 37°C e 5% de CO₂), sendo determinado o IS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados médios de três experimentos independentes foram utilizados para a análise estatística, onde os resultados foram comparados utilizando o teste one-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 mostraram efeito contra as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* cepa Y, apresentando menor toxicidade em células hospedeiras LLC-MK2. Contudo, Dq-2561[1-15] demonstrou efeito mais semelhante ao peptídeo parental, com alto índice de seletividade (72,9) e efeito antiamastigota. Logo, o menor tamanho desses peptídeos traz novas perspectivas para o surgimento de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas.

Palavras-chave: doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; dinoponeratoxinas.

ABSTRACT

Chagas disease is an important public health problem and benznidazole, the only drug used in treatment, has limited efficacy and causes serious adverse effects. In this context, it is necessary to search for therapeutic strategies that promote greater selectivity for the parasite, reducing the complications caused in the host. The venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* is rich in peptides, called dinoponeratoxins (DnTxs), whose effects make them similar to antimicrobial peptides. Dntx Dq-2561, in a recent study, showed a better antichagasic effect, with a high selectivity index (IS) (80,3), being considered the most promising, however, it was shown to be hemolytic. So, two fragments of the DnTx Dq-2561 were designed and synthesized: Dq-2561[1-15] and Dq-2561[3-15]. The objective of the present work was to evaluate the trypanocidal potential of peptides derived from DnTx Dq-2561 on the evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi* strain Y (benznidazole resistant strain). The toxicity of Dq-2561[1-15] and Dq-2561[3-15] peptides was evaluated in LLC-MK2 host cells, by the MTT reduction method. The trypanocidal effect was evaluated on epimastigotes (cultured in LIT medium, at 28°C), trypomastigotes and amastigotes (obtained through infection of LLC-MK2 cells and cultured in DMEM medium, at 37°C and 5% CO₂), being determined the IS. All tests were performed in triplicate and the average results from three independent experiments were used for statistical analysis, where the results were compared using the one-way ANOVA test, with Bonferroni's post-test. The peptides derived from DnTx Dq-2561 showed an effect against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* strain Y, presenting less toxicity in LLC-MK2 host cells. However, Dq-2561[1-15] demonstrated an effect more similar to the parental peptide, with a high selectivity index (72.9) and antiamastigote effect. Therefore, the smaller size of these peptides brings new perspectives for the emergence of new therapeutic alternatives for Chagas' disease.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; dinoponeratoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da doença de Chagas no mundo	14
Figura 2 – Manifestações clínicas da doença de Chagas	16
Figura 3 – Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 4 – Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 5 – Estrutura química do Nifurtimox e Benzonidazol	20
Figura 6 – <i>Dinoponera quadriceps</i>	21
Figura 7 – Efeito do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre células hospedeiras submetidas ao método de redução do MTT	29
Figura 8 – Efeito do peptídeo Dq-2561[3-15] sobre células hospedeiras submetidas ao método de redução do MTT	30
Figura 9 – Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas epimastigotas, após 24, 48 e 72 horas de tratamento	32
Figura 10 – Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[3-15] sobre formas epimastigotas, após 24, 48 e 72 horas de tratamento	33
Figura 11 – Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas tripomastigotas	35
Figura 12 – Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[3-15] sobre formas tripomastigotas	35
Figura 13 – Efeito do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas amastigotas, após 24 e 48 horas de tratamento, com relação ao nº amastigotas/100 células	37
Figura 14 – Efeito do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas amastigotas, após 24 e 48 horas de tratamento, com relação ao percentual de células não infectadas	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.....	24
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.....	25
Tabela 3 – Viabilidade celular (média ± EPM) das células hospedeiras, submetidas ao método de redução do MTT, após tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561	30
Tabela 4 – Viabilidade celular (média ± EPM) das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , após tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561, nos tempos de 24,48 e 72 horas	31
Tabela 5 – Viabilidade celular (média ± EPM) das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , após tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561	34
Tabela 6 – Índice de seletividade (IS) dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alanine
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BZ	Benzonidazol
CC50	Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular
CT	Controle
DC	Doença de Chagas
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DnTxs	Dinoponeratoxinas
EPM	Erro Padrão Médio
F	Phenylalanine
G	Glycine
I	Isoleucine
IC50	Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitos
IS	Índice de Seletividade
K	Lysine
L	Leucine
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Methionine
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N	Asparagine
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Proline
Q	Glutamine
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T	Threonine
UFABC	Universidade Federal do ABC
USP	Universidade de São Paulo
W	Tryptophan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Etiologia e epidemiologia da doença de Chagas	14
1.2 Vias de transmissão da doença de Chagas.....	15
1.3 Evolução e manifestações clínicas da doença de Chagas	16
1.4 Formas evolutivas e ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.5 Tratamento farmacológico da doença de Chagas	19
1.6 Potencial terapêutico de biotoxinas.....	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Linhagens celulares	24
3.2 Substâncias em estudo	24
3.3 Avaliação da toxicidade dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 em células hospedeiras	25
3.4 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.5 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	26
3.6 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	27
3.7 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Avaliação da toxicidade dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 em células hospedeiras	29
4.2 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
4.3 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	34
4.4 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	36

5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma importante parasitose cujo agente etiológico é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (FIOCRUZ, 2020).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DC é considerada uma doença tropical negligenciada pois afeta, quase em sua totalidade, populações de baixa renda, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade crônicas em países em desenvolvimento (BONNEY, 2014).

Atualmente, existem cerca de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas em 21 países da América Latina e, aproximadamente, 70 milhões de pessoas no mundo estão em risco de contrair a doença (DNDI, 2020).

Devido a rápida mobilidade populacional, crescente urbanização, e forte emigração de latino-americanos para áreas não-endêmicas, como Europa Ocidental, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália, a DC mostrou uma mudança em seu padrão epidemiológico, espalhando-se para áreas urbanas e para outros países e continentes, onde passou a ser uma ameaça emergente nessas regiões, como mostra a figura 01 (CHATELAIN, 2017; OPAS/OMS, 2020).

Figura 01. Distribuição da doença de Chagas no mundo.



Fonte: DNDI, 2020.

Desde sua descoberta por Carlos Chagas, em 1909, a DC tem sido um importante problema de saúde pública (FIOCRUZ, 2020). No Brasil, a região Nordeste é a segunda principal área endêmica para a doença no país, com prevalência de 0,84% no Estado do Ceará (CAMARGO, et al., 1984). Embora não haja estudos recentes que mensurem a soroprevalência no estado, alguns estudos realizados em municípios como Jaguaruana e Limoeiro do Norte detectaram soroprevalência de 3,1% e 4,2%, respectivamente (BORGES-PEREIRA et al., 2008; FREITAS, 2014; FIDALGO et al., 2018).

1.2 Vias de transmissão da doença de Chagas

As principais vias de transmissão da DC, no Brasil, são a vetorial, através do contato, durante o repasto sanguíneo, com os excrementos do inseto vetor triatomíneo infectado; e a oral, através da ingestão de alimentos (caldo de cana e açaí) contaminados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). A transmissão por via oral é a grande responsável pelos surtos de infecção em áreas urbanas, resultando em quadros clínicos agudos e altos índices de mortalidade (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011).

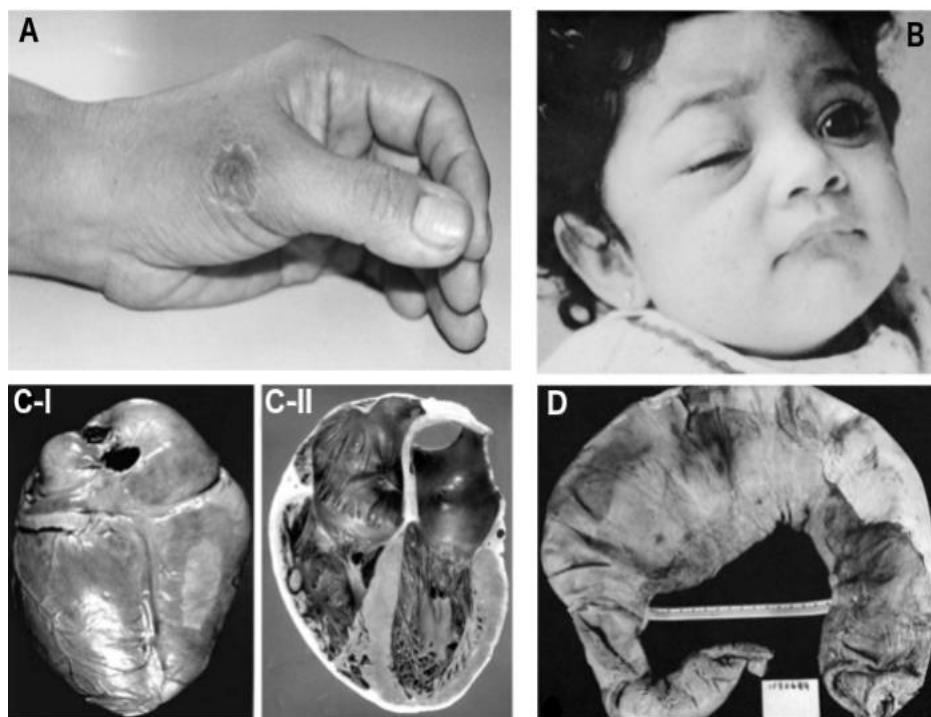
Existem ainda outras formas de transmissão: por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou pela via placentária (congênita) - sendo menos comuns, porém relatadas (CHATELAIN, 2017). Na transfusão sanguínea, o receptor acaba recebendo sangue contaminado com o parasito no entanto, essa forma de transmissão vem diminuindo em decorrência dos protocolos de triagem e rastreio realizados nos hemocentros (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). A transmissão congênita pode ocorrer em qualquer fase da gestação ou durante o parto, quando as mucosas do feto entram em contato com o sangue materno infectado (REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015).

Nos últimos anos, a transmissão por transplante de órgãos vem adquirindo importância devido ao aumento no número de procedimentos e ao estado imunossuprimido dos pacientes, corroborando para manifestações clínicas mais graves (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

1.3 Evolução e manifestações clínicas da doença de Chagas

A DC possui três fases distintas: aguda, indeterminada e crônica (CHATELAIN, 2017). A fase aguda, caracterizada pela alta parasitemia, ocorre nas 4-6 semanas após a infecção e geralmente apresenta como sintomas febre e mal-estar, considerados inespecíficos, podendo ainda apresentar-se assintomática (COSTA et al., 2011). No entanto, sinais clássicos da picada do barbeiro, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romanã, são comumente perceptíveis nessa fase da doença, como mostra a figura 02 (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Figura 02. Manifestações clínicas da doença de Chagas.



Fonte: Internet (www.isradiology.org/tropical_diseases).

Legenda: A. Chagoma na superfície dorsal da mão esquerda 21 dias após inoculação acidental; B. Criança com clássico sinal de Romaña; C. Manifestação cardíaca de paciente chagásico: I. Superfície superior do coração dilatado mostrando placas fibrosas e alargamento dos vasos coronarianos; II. Visão interior do coração revelando dilatação nas câmaras direita e esquerda; D. Megacôlon de paciente chagásico.

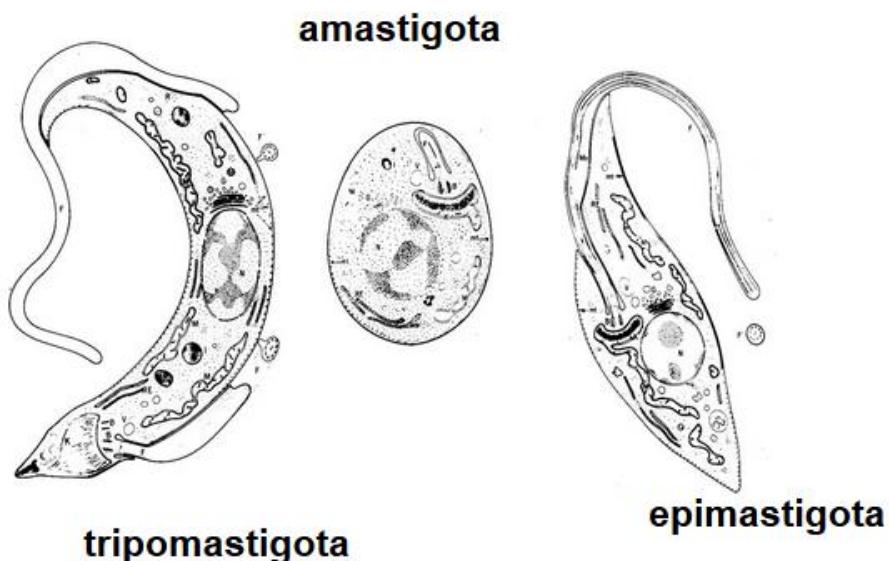
Durante a fase indeterminada da infecção, verifica-se que os portadores possuem positividade sorológica para *T. cruzi* e estudos eletrocardiográficos e radiológicos aparentemente normais (CUNHA-FILHO et al., 2012). Aproximadamente, 20-30% das pessoas infectadas evoluem para a fase crônica da doença (BERN, 2015). Nesse estágio, a cardiomiopatia chagásica é a manifestação clínica mais comum, desenvolvendo-se na grande maioria dos pacientes, porém uma minoria pode vir a desenvolver complicações digestivas, como megaesôfago e megacôlon. Tais alterações são provenientes da presença maciça das formas amastigotas do parasito nos tecidos periféricos (RIBEIRO et al., 2012; AYO et al., 2013; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; MARCHIORI, 2016).

1.4 Formas evolutivas e ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário unicelular que possui como estruturas um único flagelo e uma única mitocôndria alongada que termina em um cinetoplasto, contendo o DNA mitocondrial, sendo classificado dentro da ordem Kinetoplastida, da classe Zoomastigophorea e da família Trypanosomatidae (CHAGAS, 1909; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Tal organismo é um parasito obrigatório desenvolvendo-se em insetos hematófagos da família Reduviidae, popularmente conhecidos como “barbeiros”, em pequenos animais silvestres e domésticos, e nos seres humanos (FIOCRUZ, 2020).

No seu ciclo biológico, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas principais, como mostra a figura 03. A forma epimastigota, proliferativa e não infectante, encontrada no intestino médio do inseto vetor; e as formas tripomastigota, não proliferativa e infectante, presente na circulação sanguínea e amastigota, proliferativa intracelular, que se encontram no hospedeiro vertebrado (ADADE et al., 2013).

Figura 03. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*.



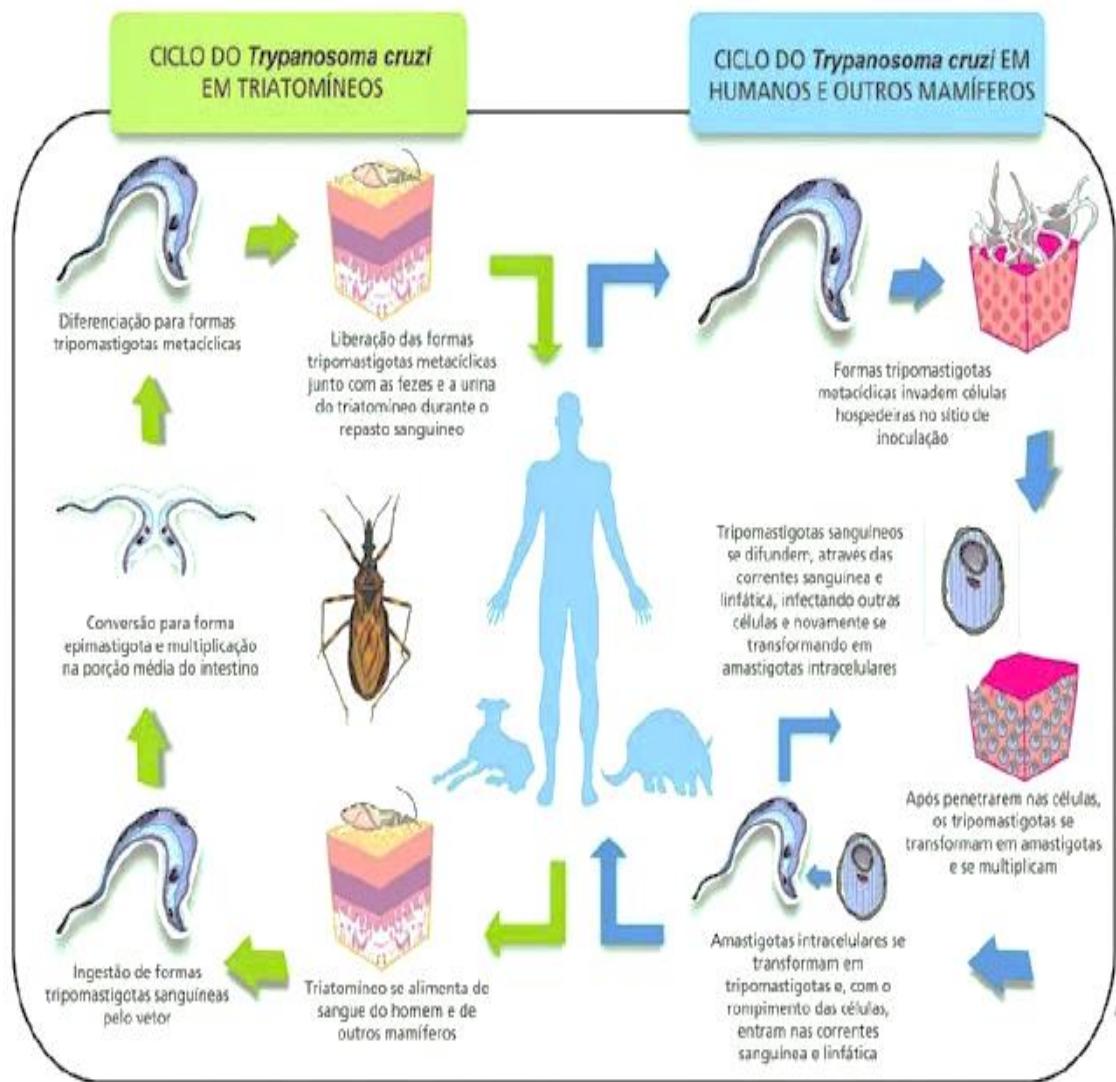
Fonte: Internet (www.icb.usp.br).

O *T. cruzi* possui um ciclo evolutivo complexo pois requer passagem obrigatória por um inseto vetor triatomíneo, onde o parasito passa por uma fase de multiplicação extracelular, e por um hospedeiro vertebrado, onde o parasito passa por uma fase de multiplicação intracelular (BONNEY, 2014; FRANCISCO et al., 2017).

A infecção por *T. cruzi* inicia-se quando o inseto vetor triatomíneo se infecta ao se alimentar do sangue contaminado, de um hospedeiro vertebrado, com as formas tripomastigotas (MEIRA et al., 2015). Após serem ingeridos pelo inseto vetor, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no intestino médio anterior do triatomíneo. Nesse ambiente, as formas epimastigotas se multiplicam, juntando-se às membranas perimicroviliares das células intestinais, e se transformam nas formas tripomastigotas metacíclicas infecciosas, liberadas durante o repasto sanguíneo juntamente com a urina e as fezes do barbeiro, no local da picada (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARIAS, 2010). No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos se ligam a receptores de superfície celular de macrófagos, levando à formação de um vacúolo parasítóforo onde se transformam nas formas amastigotas (FRANCISCO et al., 2017). Estas, após sucessivas divisões binárias, diferenciam-se em tripomastigotas, que são lançados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo infectar novas células ou contaminar um novo inseto vetor.

durante o repasto sanguíneo, como mostra a figura 04 (MUÑOZ-SARAIVA et al., 2012).

Figura 04. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Fiocruz, 2020.

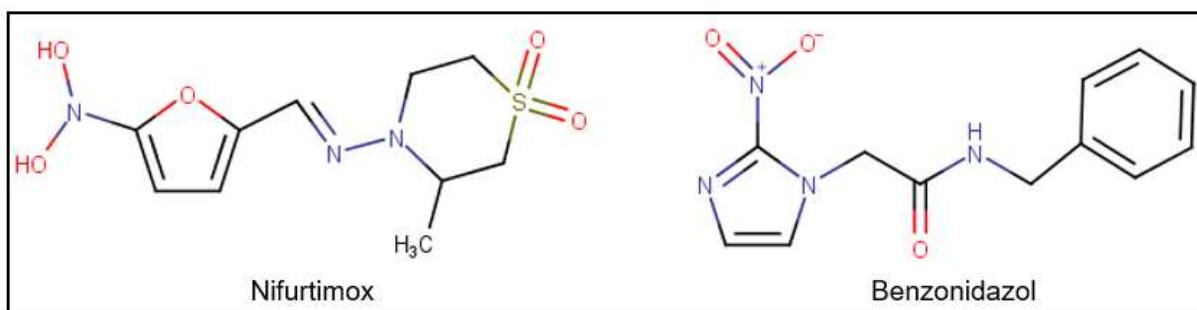
1.5 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

Em 1909, era diagnosticada a primeira paciente com DC no Brasil entretanto, mais de um século após seu descobrimento pelo médico sanitarista Carlos Chagas, tal enfermidade continua distante das prioridades do mercado farmacêutico (FIOCRUZ, 2020).

O tratamento disponível para a DC é limitado a dois fármacos existentes a mais de 50 anos, os derivados nitroimidazólicos Benzonidazol e Nifurtimox, desenvolvidos respectivamente pelos laboratórios farmacêuticos Roche® e Bayer®, como mostra a figura 05 (MORILLA; ROMERO, 2015).

No Brasil, o Nifurtimox foi proibido de ser comercializado devido a sua elevada toxicidade. Dessa forma, o único fármaco disponível atualmente no país para o tratamento da DC é o Benzonidazol (BZ), que possui eficácia limitada além de desencadear inúmeros efeitos adversos (CANÇADO, 2002).

Figura 05. Estrutura química do Nifurtimox e Benzonidazol.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2008.

Mesmo aprovado pelo Ministério da Saúde, o tratamento com BZ possui uma taxa média de cura, entre os casos recentes de infecção, de aproximadamente 80% porém, nas condições em que a doença encontra-se cronificada, essa taxa cai para menos de 20% (OLIVEIRA et al., 2008; SESTI-COSTA et al., 2014). Além disso, a necessidade de esquemas posológicos prolongados facilita o surgimento de reações adversas, diminuindo a adesão a terapia bem como, a qualidade de vida desses pacientes (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012).

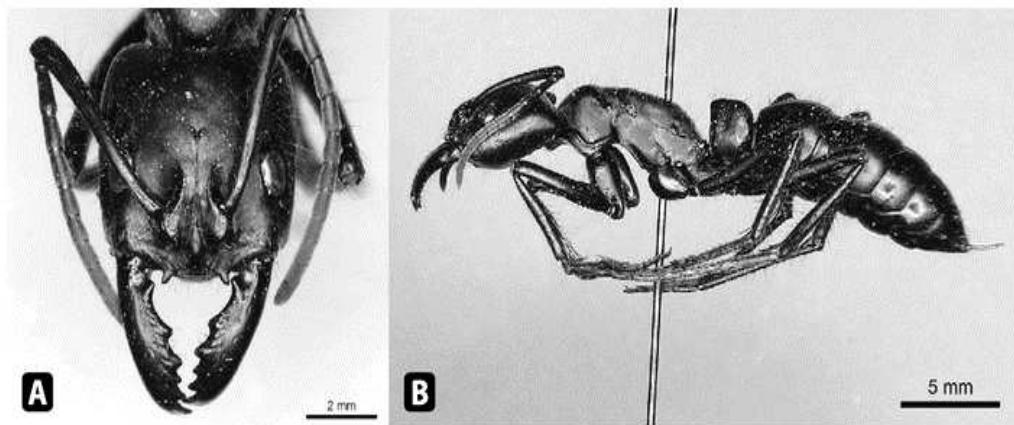
Nas primeiras semanas de tratamento, podem ser observadas reações cutâneas, dermatite atópica, erupções sensíveis à luz, febre, perda de peso, púrpura e distúrbios gastrointestinais porém, a longo prazo podem surgir leucopenia, trombocitopenia e distúrbios neurológicos, fazendo-se necessária a pesquisa por novas alternativas terapêuticas que apresentem maior seletividade pelo parasito, diminuindo as complicações causadas no hospedeiro (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DNDi, 2020).

1.6 Potencial terapêutico de biotoxinas

Nos últimos anos, as toxinas animais vêm sendo estudadas pelo grande potencial biotecnológico que apresentam, despertando o interesse da comunidade científica como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 2014).

A espécie *Dinoponera quadriceps*, conhecida popularmente como “formiga gigante”, como mostra a figura 06, pertence a subfamília Poneriane e encontra-se amplamente distribuída pelo Nordeste brasileiro (PAIVA; BRANDÃO, 1995). Seu veneno, em diferentes estudos, demonstrou grande potencial antinociceptivo (SOUZA et al., 2012), anticonvulsivante (LOPES et al., 2013), anti-inflamatório e anticoagulante (MADEIRA et al., 2015), antimicrobiano (LIMA et al., 2014), e antiparasitário (LIMA et al., 2016).

Figura 06. *Dinoponera quadriceps*.



Fonte: LATTKE, 2015.

Legenda: A. Cabeça com vista frontal; B. Corpo em vista lateral.

Previamente, nosso grupo de pesquisa realizou a análise do transcriptoma da glândula de veneno de *D. quadriceps* que revelou um repertório de toxinas, as quais incluem as dinoponeratoxinas (DnTxs), componentes semelhantes a peptídeos antimicrobianos encontrados em venenos de outros animais (TORRES et al., 2014).

Peptídeos antimicrobianos são um grupo heterogêneo de proteínas animais e vegetais, produzidas como mecanismo de defesa contra espécies invasoras. Esses peptídeos possuem tamanho pequeno, geralmente inferior a 50

resíduos de aminoácidos, e natureza catiônica e anfipática, características que permitem uma alta permeabilidade através das membranas lipídicas, levando à morte dos microrganismos invasores (TORRENT et al., 2013). Além disso, devido a essas propriedades, tais peptídeos podem ser facilmente modificados com o intuito de melhorar sua estabilidade *in vivo* e atividade biológica (SUN; SUN; HUANG, 2016; YAVARI et al., 2018).

O momento hidrofóbico (μ H) e a hidrofobicidade, juntamente com a carga líquida (Z), são parâmetros amplamente utilizados nos estudos de análise racional das interações peptídeo – bicamada lipídica (DRIN; ANTONNY, 2010). Sendo assim, as diferentes propriedades físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos são utilizadas para caracterizá-los, prevendo seu comportamento ao interagir com as diferentes composições das membranas celulares (SALDITT; LI; SPAAR, 2006; LI; DING; MA, 2016).

Com base na análise peptidômica, quatro sequências de DnTxs (Dq-3348, com 30 resíduos de aminoácidos; Dq-2561 com 23 resíduos de aminoácidos; Dq-1503, com 13 resíduos de aminoácidos; e Dq-1319 com 11 resíduos de aminoácidos) foram selecionadas, sintetizadas e testadas contra as três formas de desenvolvimento de uma cepa resistente de *T. cruzi*. De acordo com o estudo de LIMA e colaboradores (2018), dentre essas dinoponeratoxinas, a DnTx Dq-2561 apresentou melhor efeito antichagásico, com alta seletividade, sendo então considerada a mais promissora contudo, mostrou-se hemolítica. Além disso, o tamanho de sua cadeia de aminoácidos torna sua síntese muito cara, evidenciando a necessidade de modificações moleculares para estudos posteriores (MARIANO et al., 2019).

Sendo assim, o atual cenário farmacológico aplicado à DC chama a atenção para a necessidade de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos (LIMA et al., 2018). Dentro desse contexto, substâncias bioativas, de origem natural, como as DnTxs podem servir de modelo para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, essenciais para países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a DC representa um importante problema de saúde pública. Além disso, estudos que empregam biotecnologia na prospecção de moléculas terapêuticas são de suma importância para a valorização dos recursos naturais e para o desenvolvimento científico-tecnológico em países emergentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561, provenientes do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 em células hospedeiras (LLC-MK2);
- Avaliar o efeito antiparasitário dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

No desenho experimental foram utilizadas as células LLC-MK2 - linhagem imortalizada de células tubulares renais de macaco (*Macaca mulatta*) - como células hospedeiras, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ); formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, doadas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitos, da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Substâncias em estudo

Os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 (tabela 01) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Compostos Bioativos da Universidade Federal do ABC (UFABC), coordenado pelo professor Vani Xavier Oliveira Júnior e cadastrados no SISGEN (nº A03AA38) através do projeto intitulado “Efeitos biológicos de venenos e peptídeos de origem animal”.

Tabela 01. Sequência de aminoácidos dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos
Dq-2561	FWGTLAKWALKAIIPAAMGMKQNK
Dq-2561[1-15]	FWGTLAKWALKAIIPA
Dq-2561[3-15]	GTLAKWALKAIIPA

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para aumentar a atividade antichagásica da DnTx Dq-2561 foram propostos dois fragmentos: um fragmento N-terminal com 15 aminoácidos (Dq-2561[1-15] – peptídeo derivado 1) e, a partir da retirada dos dois primeiros resíduos, um outro fragmento com 13 aminoácidos (Dq-2561[3-15] – peptídeo derivado 2), os quais, após as fragmentações, apresentaram as seguintes características (tabela 02):

Tabela 02. Propriedades físico-químicas dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.

Peptídeos	Peso molecular	Z	Hidrofobicidade	μ H
Dq-2561	2526,13	5	0,509	0,248
Dq-2561[1-15]	1673,0	3	0,782	0,411
Dq-2561[3-15]	1339,62	3	0,592	0,277

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Z: carga líquida; μ H: momento hidrofóbico.

3.3 Avaliação da toxicidade dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 em células hospedeiras

As células LLC-MK2, utilizadas como células hospedeiras, foram cultivadas em garrafa de cultivo celular estéril, na concentração de 10^5 células/mL, determinada por contagem em câmara de Neubauer com azul de Trypan (0,4%) e mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, sendo repicadas ao atingirem estado de confluência.

Para determinação da toxicidade, as células LLC-MK2 foram cultivadas em placa estéril de 96 poços, na concentração de 10^5 células/mL, em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e antibióticos, sendo mantidas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C.

Após 24 horas de incubação, as células LLC-MK2 foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 μ M), e a avaliação da viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de redução do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), que se baseia na capacidade de células viáveis, ao internalizarem o MTT, um sal tetrazólio amarelado, o reduzirem, através da ação de desidrogenases mitocondriais, à cristais arroxeados e insolúveis de formazan (MOSMANN, 1983).

Decorridas 24 horas de tratamento, foi adicionado a placa 10 μ L/poço de uma solução de MTT (2,5 mg/mL) e após incubação por 4 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, a solubilização dos cristais de formazan foi feita em dodecil sulfato de sódio (SDS) por 17 horas. A absorbância foi medida a 570nm, em

leitor de microplacas (Biochrom® ASYS Expert Plus), e os valores da CC50 – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular – foram avaliados por regressão não linear, servindo para selecionar as concentrações de trabalho para os testes *in vitro* de atividade tripanocida (MENEZES, 2017).

3.4 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em garrafa de cultivo celular estéril, na concentração de 10^6 parasitos/mL, em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e mantidas a 28°C em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand), sendo repicadas a cada 7 dias.

Para a avaliação do efeito dos peptídeos, as formas epimastigotas foram cultivadas em placa estéril de 96 poços, na concentração de 10^6 parasitos/mL, em meio LIT suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e mantidas a 28°C em estufa BOD, após tratamento com diferentes concentrações dos peptídeos (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 µM) (RODRIGUES et al., 2014).

Decorridos os tempos de 24, 48 e 72 horas foram realizadas as quantificações dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer e os valores da IC50 – concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitos – foram avaliados por regressão não linear (LIMA et al., 2016).

3.5 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 (10^5 células/mL) cultivadas em garrafa de cultivo celular estéril e infectadas na concentração de 10^7 parasitos/mL. A infecção foi mantida por 5 a 7 dias em meio DMEM, suplementado com 2% de SBF e antibióticos, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C.

Para a avaliação do efeito dos peptídeos, as formas tripomastigotas foram cultivadas em placa estéril de 96 poços, na concentração de 10^6 parasitos/mL, em meio DMEM, suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e mantidas a 37°C em

estufa com atmosfera de 5% de CO₂, após tratamento com diferentes concentrações dos peptídeos (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 µM) (MEIRA et al., 2015).

Decorridas 24 horas, foi realizada a quantificação dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer e os valores da IC50 foram calculados em comparação com o controle negativo não tratado (LIMA et al., 2016). Além disso, foi possível determinar o índice de seletividade (IS) dos peptídeos derivados, através da razão entre a CC50 das células hospedeiras e a IC50 das formas tripomastigotas (NWAKA; HUDSON, 2006).

3.6 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para a avaliação do efeito dos peptídeos, as células LLC-MK2, na concentração de 10⁵ células/mL, foram cultivadas em placa estéril de 24 poços, sobre lamínulas estéreis, em meio DMEM, suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

Após 24 horas de incubação, as células LLC-MK2 foram infectadas com formas tripomastigotas, na concentração de 10⁷ parasitos/mL, em meio DMEM, suplementado com 2% de SBF e antibióticos, e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, por 48 horas, para que houvesse a internalização celular das formas tripomastigotas e consequente transformação em formas amastigotas (ADADE, et al., 2013).

Após 48 horas da infecção, foi realizado o tratamento com a IC50 (0,59 µM), proveniente do ensaio em formas tripomastigotas do peptídeo Dq-2561[1-15], e após 24 e 48 horas de tratamento, as lamínulas foram fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa, para montagem das lâminas.

O efeito dos peptídeos sobre as formas amastigotas foi determinado através da contagem do número de amastigotas/100 células e pelo percentual de células não infectadas, através da contagem de 300 células por lamínula, em microscópio óptico (MONTEIRO, 2019).

3.7 Análise estatística

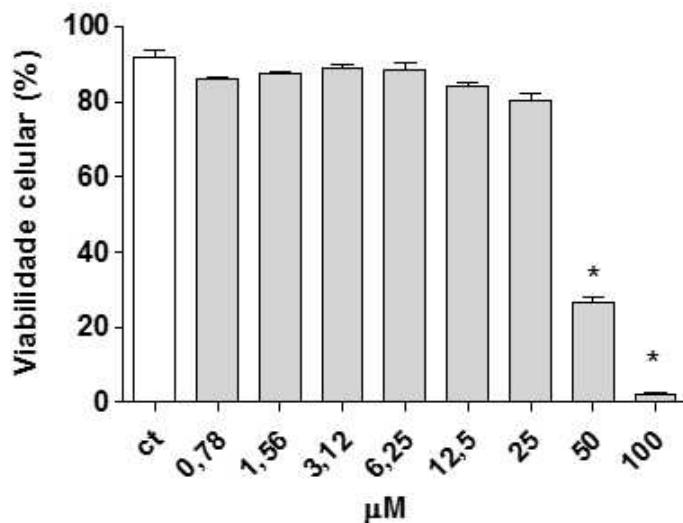
Em todos os ensaios foram realizados três experimentos independentes, em triplicata, e os resultados foram expressos como sendo a média \pm o erro padrão da média (EPM). As análises de significância foram realizadas através do teste one-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism ®, versão 5.0 para Windows, sendo considerado $p < 0,05$ como critério de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da toxicidade dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 em células hospedeiras

A toxicidade dos peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] foi avaliada em células LLC-MK2, utilizadas como células hospedeiras, pelo método de redução do MTT. Após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 μM), foi observada uma diminuição da viabilidade celular nos grupos tratados com as maiores concentrações (100 e 50 μM), conforme demonstrado pelas figuras 07 e 08, e os valores obtidos da CC₅₀, em relação ao controle negativo não tratado, foram, respectivamente, $43,05 \pm 1,82 \mu\text{M}$ para Dq-2561[1-15] e $188,86 \pm 1,77 \mu\text{M}$ para Dq-2561[3-15], conforme mostra a tabela 03.

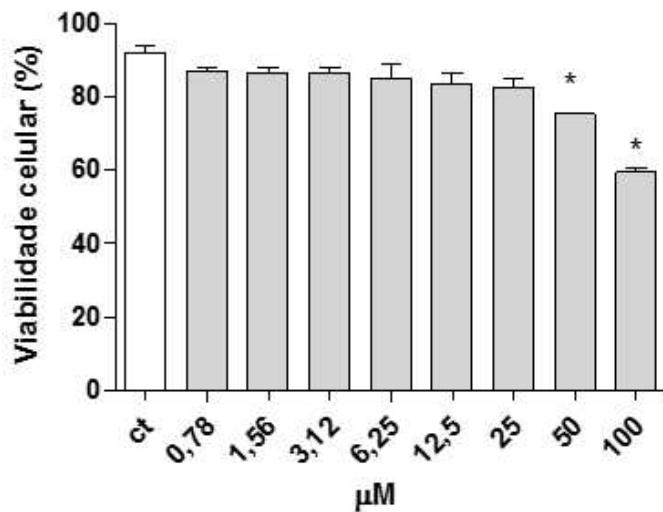
Figura 07. Efeito do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre células hospedeiras submetidas ao método de redução do MTT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ct).

Figura 08. Efeito do peptídeo Dq-2561[3-15] sobre células hospedeiras submetidas ao método de redução do MTT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle (ct).

O peptídeo Dq-2561[1-15] foi mais tóxico à célula hospedeira (LLC-MK2) quando comparado ao peptídeo Dq-2561[3-15], e em relação ao peptídeo parental, os peptídeos derivados apresentaram menor toxicidade.

Tabela 03. Viabilidade celular (média \pm EPM) das células hospedeiras, submetidas ao método de redução do MTT, após tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.

Peptídeos	CC50/24h
Dq-2561	$25,7 \pm 2 \mu\text{M}$
Dq-2561[1-15]	$43,05 \pm 1,82 \mu\text{M}$
Dq-2561[3-15]	$188,86 \pm 1,77 \mu\text{M}$
BZ	$614,8 \pm 30 \mu\text{M}$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle. BZ = benzonidazol.

4.2 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A avaliação do efeito dos peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] foi realizada sobre as formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 µM).

A viabilidade celular foi obtida em relação ao controle negativo não tratado, e os respectivos valores de IC50 para os peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15], nos diferentes tempos, estão dispostos na tabela 04.

Tabela 04. Viabilidade celular (média ± EPM) das formas epimastigotas de *T. cruzi*, após tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561, nos tempos de 24,48 e 72 horas.

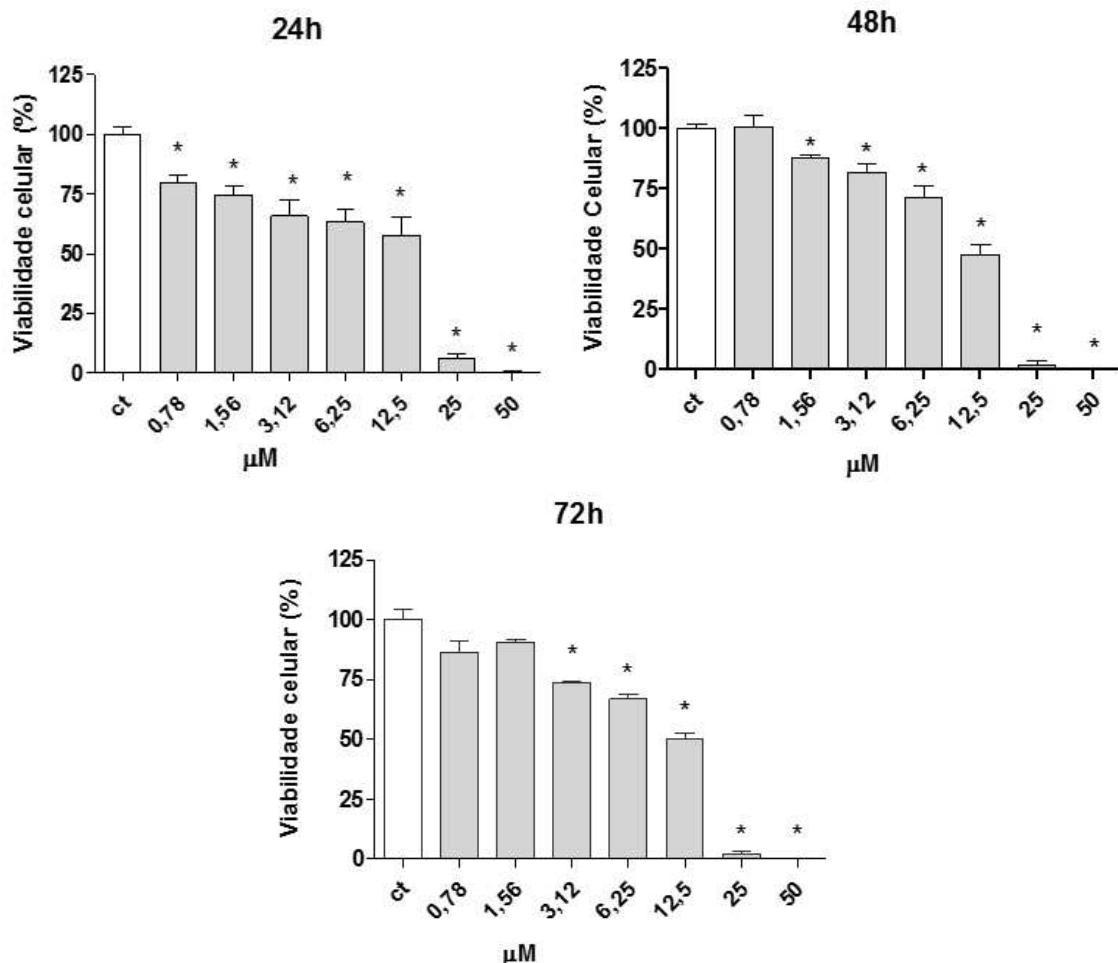
Peptídeos	IC50/24h	IC50/48h	IC50/72h
Dq-2561	4,7 ± 1 µM	3,6 ± 0,5 µM	2,4 ± 0,4 µM
Dq-2561[1-15]	7,2 ± 1,4 µM	9,7 ± 0,9 µM	8,7 ± 0,6 µM
Dq-2561[3-15]	59,9 ± 1,6 µM	156 ± 1,3 µM	392 ± 3,4 µM
BZ	218,0 ± 15 µM	61,1 ± 3 µM	16,5 ± 1 µM

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle. BZ = benzonidazol.

O peptídeo Dq-2561[1-15] demonstrou valores menores de IC50, quando comparado ao peptídeo Dq-2561[3-15], os quais não mostraram alterações expressivas entre os três tempos. Além disso, foi observada uma diminuição da viabilidade celular, principalmente, nos grupos tratados com as maiores concentrações (50 e 25 µM) e isso pode ser verificado na figura 09.

Figura 09. Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas epimastigotas, após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

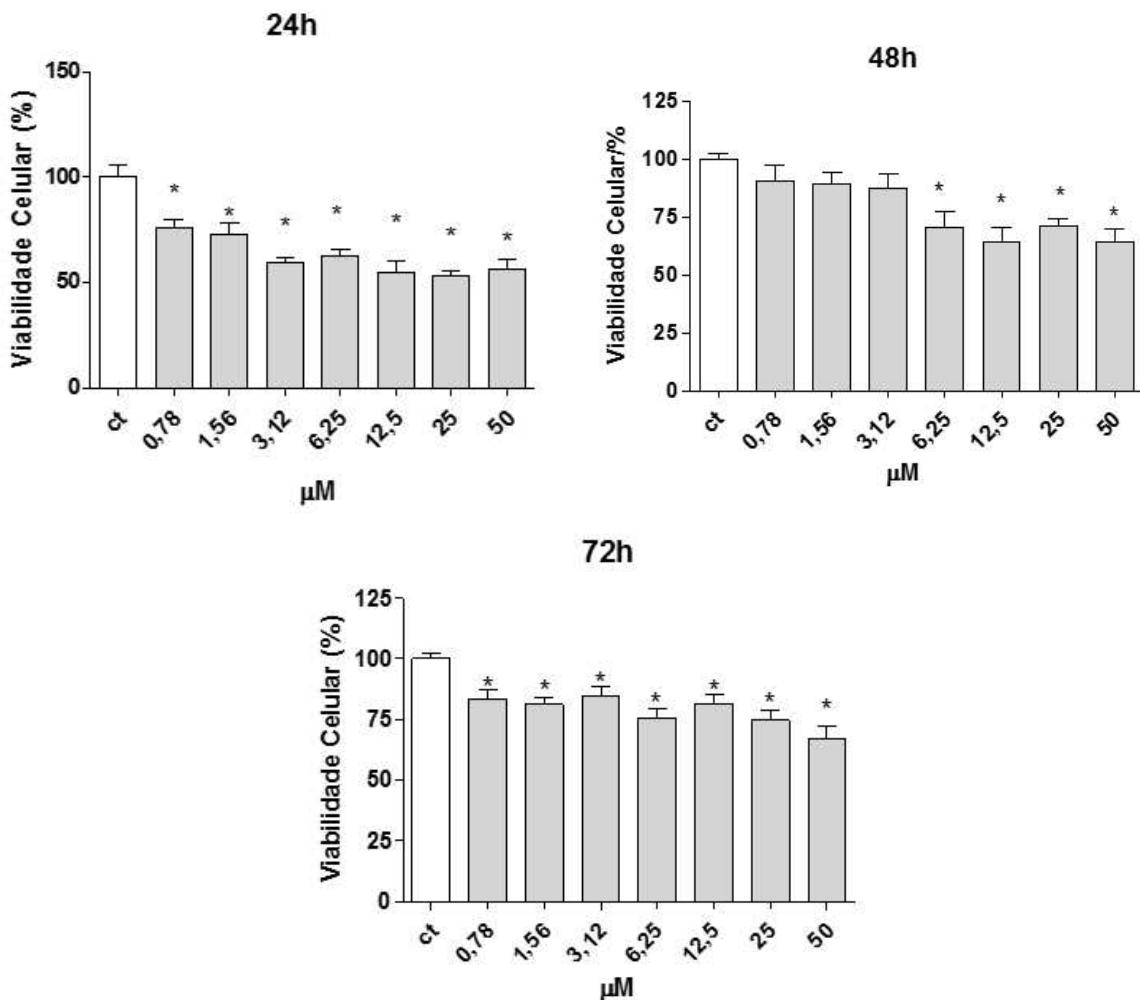


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle (ct).

O peptídeo Dq-2561[3-15], por sua vez, demonstrou valores maiores de IC50, quando comparado ao peptídeo Dq-2561[1-15], os quais mostraram um aumento progressivo nos três tempos de tratamento, como pode ser verificado na figura 10.

Figura 10. Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[3-15] sobre formas epimastigotas, após 24, 48 e 72 horas de tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle (ct).

Em relação ao peptídeo parental, os peptídeos derivados apresentaram aumento nos valores de suas respectivas IC50, nos três tempos de tratamento. Contudo, em relação ao BZ, verifica-se que o peptídeo Dq-2561[1-15] possui valores menores de IC50, nos três tempos de tratamento enquanto que, o peptídeo Dq-2561[3-15] possui valores menores de IC50, apenas no tempo de 24 horas.

4.3 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A avaliação do efeito dos peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] foi realizada sobre as formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 µM).

A viabilidade celular foi obtida em relação ao controle negativo não tratado, e os respectivos valores obtidos de IC50 foram $0,59 \pm 0,05 \mu\text{M}$ para Dq-2561[1-15] e $8,76 \pm 2,33 \mu\text{M}$ para Dq-2561[3-15], conforme observado na tabela 05.

Tabela 05. Viabilidade celular (média ± EPM) das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, após tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.

Peptídeos	IC50/24h
Dq-2561	$0,32 \pm 0,03 \mu\text{M}$
Dq-2561[1-15]	$0,59 \pm 0,05 \mu\text{M}$
Dq-2561[3-15]	$8,76 \pm 2,33 \mu\text{M}$
BZ	$282 \pm 20 \mu\text{M}$

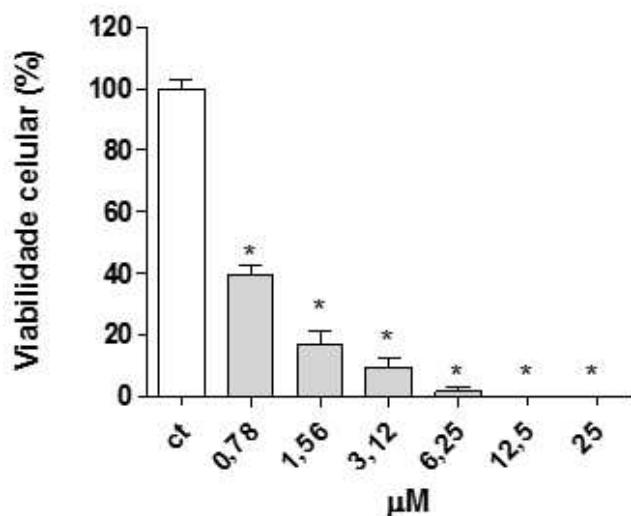
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. BZ = benzonidazol.

De acordo com as figuras 11 e 12, os peptídeos derivados mostraram redução na viabilidade celular de todos os grupos tratados, entretanto o peptídeo Dq-2561[1-15] possui valor de IC50 oito vezes menor em comparação ao peptídeo Dq-2561[3-15].

Em relação ao peptídeo parental, verifica-se uma redução pouco expressiva no valor de IC50 quando comparado ao peptídeo Dq-2561[1-15] porém, quando comparados ao BZ, os peptídeos derivados apresentaram valores menores de IC50.

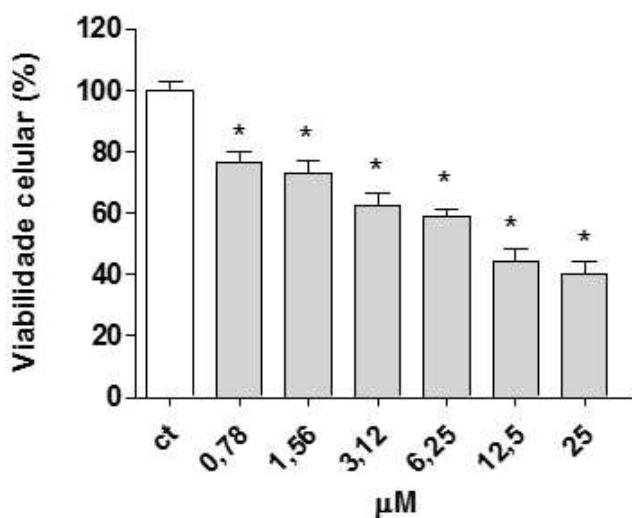
Figura 11. Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas tripomastigotas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle (ct).

Figura 12. Efeito tripanocida do peptídeo Dq-2561[3-15] sobre formas tripomastigotas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle (ct).

Além disso, obtidos os valores de CC50, provenientes das células hospedeiras (LLC-MK2), e os valores de IC50, provenientes das formas tripomastigotas, foi possível calcular o IS através da seguinte razão: CC50/IC50.

Sendo assim, o peptídeo Dq-2561[1-15] apresentou IS de 72,9 enquanto que, o peptídeo Dq-2561[3-15] apresentou IS de 21,56, conforme mostra a tabela 06.

Tabela 06. Índice de seletividade (IS) dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561.

Peptídeos	IS
Dq-2561	80,3
Dq-2561 (1-15)	72,9
Dq-2561 (3-15)	21,56
BZ	2,18

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os peptídeos derivados perderam seletividade quando comparados ao peptídeo parental, entretanto essa diminuição foi pouco expressiva para o peptídeo Dq-2561[1-15], mostrando-se promissor ($IS > 50$).

4.4 Estudo do efeito dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O peptídeo Dq-2561[1-15] demonstrou-se mais promissor sobre as formas tripomastigotas sendo assim, foi escolhido para a realização dos testes sobre as formas amastigotas.

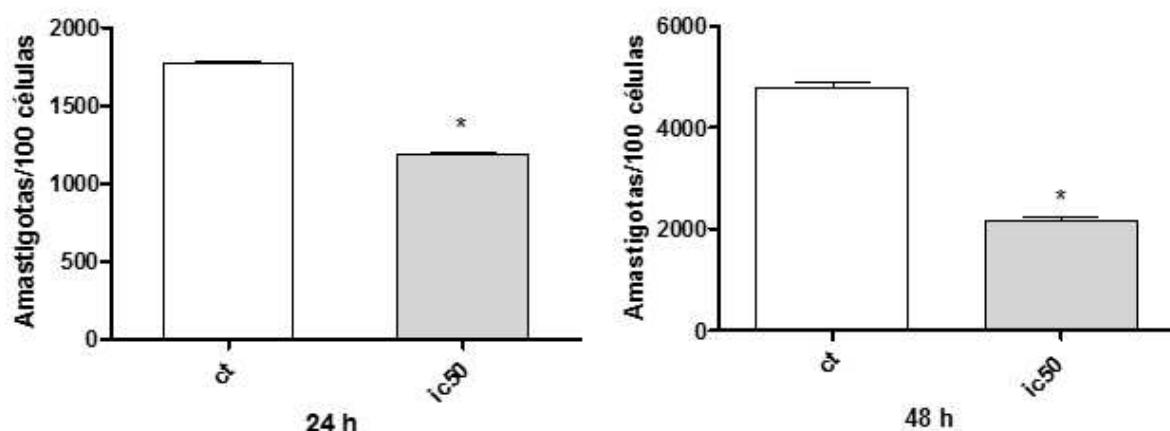
Utilizando como concentração a ser testada, a IC50 (0,59 μ M) do ensaio de viabilidade celular em tripomastigotas, foram realizados testes nos tempos de 24 e 48 horas.

De acordo com os parâmetros avaliados - número de amastigotas/100 células e percentual de células não infectadas - o peptídeo Dq-2561[1-15] mostrou efeito em ambos, como pode ser observado nas figuras 13 e 14.

Com relação ao número de amastigotas/100 células, verificou-se uma diminuição significativa nesse parâmetro nos dois períodos de tempo (24 e 48 horas), entretanto com relação ao percentual de células não infectadas, observou-se um

aumento desse parâmetro, porém sem diferenças significativas entre os dois períodos de tempo.

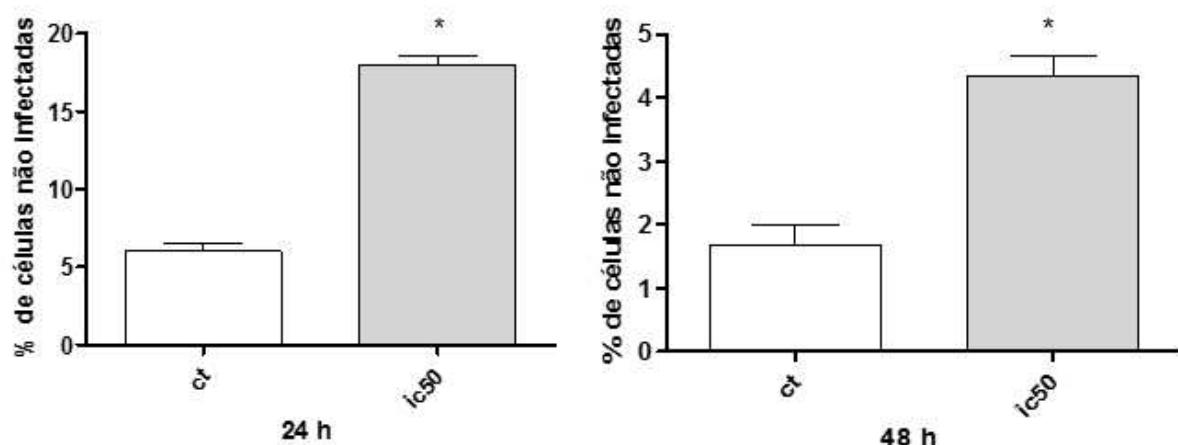
Figura 13. Efeito do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas amastigotas, após 24 e 48 horas de tratamento, com relação ao nº amastigotas/100 células.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle (ct).

Figura 14. Efeito do peptídeo Dq-2561[1-15] sobre formas amastigotas, após 24 e 48 horas de tratamento, com relação ao percentual de células não infectadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os resultados são mostrados como média ± EPM. A análise estatística foi feita com one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle (ct).

5 DISCUSSÃO

A DC tem sido um importante problema de saúde pública, sendo responsável por altos índices de morbidade e mortalidade em países emergentes (BONNEY, 2014; FIOCRUZ, 2020).

O único fármaco disponível no Brasil para o tratamento da DC, cujo agente etiológico é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é o BZ - medicamento desenvolvido a mais de 50 anos que apresenta eficácia limitada e alta toxicidade, desencadeando graves efeitos adversos (CANÇADO, 2002; MORILLA; ROMERO, 2015). Além disso, já foram relatadas cepas resistentes ao BZ, surgindo assim a necessidade urgente de novas estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade pelo parasito, diminuindo as complicações causadas no hospedeiro (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; RODRIGUES et al., 2014).

Nesse contexto, as toxinas animais vêm sendo estudadas pelo grande potencial biotecnológico que apresentam, tornando-se fontes de prospecção de novas alternativas farmacológicas para o tratamento da DC (HARVEY, 2014).

O veneno da formiga gigante *Dinoponera quadriceps* já havia sido descrito por suas propriedades farmacológicas, sendo avaliado quanto às atividades antinociceptiva (SOUSA et al., 2012), anticonvulsivante (LOPES et al., 2013), anti-inflamatória e anticoagulante (MADEIRA et al., 2015), antimicrobiana (LIMA et al., 2014) e antiparasitária (LIMA et al., 2016). Estudos acerca de sua composição majoritária revelaram as DnTxs, peptídeos cujos efeitos vêm sendo estudados pela comunidade científica (TORRES et al., 2014; MARIANO et al., 2019).

Recentemente, foi demonstrado que esses peptídeos apresentaram efeito antimicrobiano (COLOGNA et al., 2013; DODOU LIMA; CAVALCANTE; RÁDIS-BAPTISTA, 2020; ROCHA et al., 2021), antifúngico (DODOU LIMA; CAVALCANTE; RÁDIS-BAPTISTA, 2020) e antiparasitário (LIMA et al., 2018), tornando as DnTxs objetos de estudo bastante atraentes.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito antiparasitário dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 sobre as três formas de desenvolvimento do parasito *Trypanosoma cruzi* cepa Y.

De acordo com o estudo de LIMA e colaboradores (2018), dentre as DnTxs desenhadas e testadas, a DnTx Dq-2561 apresentou efeito antichagásico promissor,

com alto índice de seletividade (80,3), porém devido ao efeito hemolítico, foram necessárias modificações moleculares.

A avaliação da toxicidade em células hospedeiras (LLC-MK2), utilizando o método de redução do MTT, revelou que os peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] apresentaram diminuição da viabilidade celular nos grupos tratados com as maiores concentrações (100 e 50 µM). Quando comparados ao peptídeo parental, verificou-se que Dq-2561[3-15] apresenta citotoxicidade 7 vezes menor. Quando comparados ao BZ, os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 possuem maior citotoxicidade.

As células LLC-MK2, utilizadas como células hospedeiras, constituem uma linhagem bem estabelecida para a obtenção de formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, pois possuem boa adesão e alto percentual de internalização das formas parasitárias. Dessa forma, os ensaios de viabilidade celular dos peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 serviram para definir as concentrações a serem utilizadas nos ensaios *in vitro* de atividade tripanocida (ADADE et al., 2013; MEIRA et al., 2015; MENEZES, 2017).

A partir dos dados obtidos, foi investigada a atividade dos peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Embora tais formas de desenvolvimento sejam consideradas não infectantes, são amplamente utilizadas em modelos experimentais para triagem de substâncias tripanocidas (ZINGALES et al., 1997).

O peptídeo Dq-2561[1-15] não mostrou alterações expressivas nos valores de IC₅₀, nos três tempos de tratamento, porém apresentou melhor atividade quando comparado ao peptídeo Dq-2561[3-15], sendo observada uma diminuição da viabilidade celular, principalmente, nos grupos tratados com as maiores concentrações (50 e 25 µM). Contudo, quando comparados ao peptídeo parental, ambos apresentaram perda de efeito com aumento nos valores de suas respectivas IC₅₀, nos três tempos de tratamento.

As formas tripomastigotas foram mais susceptíveis ao tratamento com os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 do que as formas epimastigotas. Tais formas evolutivas não proliferativas e infectantes estão presentes na corrente sanguínea do homem e de outros hospedeiros vertebrados (BERN, 2015).

No presente estudo, os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 mostraram redução na atividade tripanocida de todos os grupos tratados. Entretanto, o peptídeo

Dq-2561[1-15] possui valor de IC₅₀ oito vezes menor em comparação ao peptídeo Dq-2561[3-15]. Contudo, quando comparados ao BZ, os peptídeos derivados apresentaram valores menores de IC₅₀.

Os venenos de artrópodes são misturas complexas de moléculas e compostos que apresentam diversas atividades biológicas, incluindo os peptídeos antimicrobianos que atuam contra vários tipos de microrganismos através do comprometimento da integridade da membrana celular (SABIÁ JÚNIOR et al., 2019).

Recentemente, peptídeos provenientes de venenos animais, cujo efeito é semelhante ao dos peptídeos antimicrobianos, foram utilizados como protótipos para o desenvolvimento de substâncias tripanocidas. Alguns exemplos incluem, os peptídeos provenientes do veneno da abelha-européia *Apis mellifera* (ADADE et al., 2013) e os peptídeos provenientes do veneno da vespa *Polybia paulista* (VINHOTE et al., 2017; FREIRE et al., 2020).

Os peptídeos derivados, com relação as suas propriedades físico-químicas, apresentaram redução de carga líquida (*Z*) quando comparados ao peptídeo parental. No entanto, Dq-2561[1-15] mostrou valores aumentados de hidrofobicidade e momento hidrofóbico. O aumento desses parâmetros acaba permitindo uma maior interação com a membrana do parasito, corroborando com a maior atividade tripanocida exibida por este peptídeo (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1982).

Para que uma substância seja considerada promissora é necessário que apresente seletividade sobre as células-alvo sem provocar lesão expressiva sobre as células hospedeiras (PENA; SCARONE; SERRA, 2015). De acordo com as diretrizes da OMS, para que um candidato a substância antichagásica seja considerado promissor é preciso que apresente IS > 50, o qual é calculado através da razão entre a CC₅₀ das células hospedeiras e a IC₅₀ das formas tripomastigotas (NWAKA; HUDSON, 2006).

O peptídeo Dq-2561[1-15] apresentou IS de 72,9 enquanto que, o peptídeo Dq-2561[3-15] apresentou IS de 21,56. Sendo assim, quando comparados ao peptídeo parental (80,3), os peptídeos derivados perderam seletividade, entretanto essa diminuição foi pouco expressiva para o peptídeo Dq-2561[1-15], mantendo os critérios da OMS para ser considerado promissor.

Na busca por novas substâncias antichagásicas, além de ser necessário um IS > 50, também é preciso que as mesmas apresentem efeito antiamastigota. As

formas amastigotas são as responsáveis pela manutenção da infecção por *T. cruzi* e o BZ, único fármaco disponível para o tratamento, possui falha terapêutica quando a DC se encontra cronificada, sendo necessário altas doses, incompatíveis devido à elevada toxicidade (SESTI-COSTA et al., 2014; MORILLA; ROMERO, 2015).

O peptídeo mais promissor (Dq-2561[1-15]) foi escolhido para a realização dos testes sobre as formas amastigotas. De acordo com os parâmetros avaliados - número de amastigotas/100 células e percentual de células não infectadas - Dq-2561[1-15] mostrou efeito em ambos. Com relação ao número de amastigotas/100 células, verificou-se uma diminuição significativa nesse parâmetro nos dois períodos de tempo (24 e 48 horas) entretanto, com relação ao percentual de células não infectadas, observou-se um aumento desse parâmetro, porém sem diferenças significativas entre os dois períodos de tempo.

Por fim, embora os peptídeos Dq-2561[1-15] e Dq-2561[3-15] tenham perdido potência e seletividade quando comparados ao peptídeo parental, devido à redução no número de aminoácidos, foi possível observar ao longo deste estudo que o peptídeo Dq-2561[1-15] ainda apresentou-se como uma molécula promissora, continuando dentro dos critérios da OMS na busca por substâncias antichagásicas (NWAKA; HUDSON, 2006). Além disso, o número reduzido de aminoácidos baixa os custos de síntese, abrindo perspectivas para novas modificações moleculares e estudos futuros para avaliação dos mecanismos de morte celular e efeito hemolítico.

6 CONCLUSÃO

Os peptídeos derivados da DnTx Dq-2561 apresentaram efeito contra as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* cepa Y. Contudo, Dq-2561[1-15] demonstrou efeito mais semelhante ao peptídeo parental, com alto índice de seletividade e efeito antiamastigota, apresentando-se como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas.

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.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.
- AYO, C. M. 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.
- BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: A public health success or an emerging threat? **Parasite**, 2014.
- BORGES-PEREIRA, J. et al. Epidemiologia da doença de Chagas em quatro localidades rurais de Jaguarauna, Estado do Ceará. Soroprevalência da infecção, parasitemia e aspectos clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 345-351, jul/ago, 2008.
- CAMARGO, M. E. et al. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975-1980. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, p. 192-204, 1984.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 44, p. 29–37, 2002.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiae 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**, p. 1–170, 1909.
- CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2017.
- COLOGNA, C. T. et al. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 413–422, 6 dez. 2013.
- COSTA, M. et al. Doença de Chagas: uma revisão bibliográfica. **Biological Sciences**, 2011.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

CUNHA-FILHO, M. et al. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. **Brasília Med**, v. 49, n. 4, p. 279–283, 2012.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 683230, 19 ago. 2014.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DOENÇA DE CHAGAS – PORTAL FIOCRUZ. **FIOCRUZ**, 2020. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/doenca-de-chagas>. Acesso em: 21 de dez. de 2020.

DODOU LIMA, H. V.; CAVALCANTE, C. S. DE P.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Antimicrobial activity synthetic Dq-3162, a 28-reside ponerin G-like dinoponeratoxin from the giant ant *Dinoponera quadriceps* venom, against carbapenem-resistant bacteria. **Toxicon**, v. 187, p. 19-28, 2020.

DODOU LIMA, H. V.; CAVALCANTE, C. S. DE P.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Antifungal In Vitro Activity of Pilosulin and Ponerin-like Peptides from the Giant Ant *Dinoponera quadriceps* and Synergistic Effects with Antimycotic Drugs. **Antibiotics**, 2020.

DRIN, G.; ANTONNY, B. Amphipathic helices and membrane curvature. **FEBS letters**, v. 584, n. 9, p. 1840–7, 2010.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **DNDi**, 2020. Disponível em: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas>. Acesso em: 13 de dez. de 2020.

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, 1982.

FIDALGO, A. S. O. B. V. et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2018.

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

FREIRE, K. A. et al. Wasp venom peptide as a new antichagasic agent. **Toxicon**, v. 181, p. 71-78, 2020.

FREITAS, E. C. **Inquérito soroepidemiológico da doença de Chagas no município de Limoeiro do Norte, Ceará em 2013**. 2014. . Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2014.

- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.
- HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, 2014.
- HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 2012.
- LI, Z.; DING, H.; MA, Y. Interaction of peptides with cell membranes: insights from molecular modeling. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 28, n. 8, p. 83001, 2016.
- LIMA, D. B. et al. Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 390–6, ago. 2014.
- LIMA, D. B. et al. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128–132, 2016.
- LIMA, D. B. et al. The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display in vitro antitrypanosomal activity. **Biological Chemistry**, v. 0, n. 0, jan. 2018.
- LOPES, K. S. et al. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 3, p. 141–5, set. 2013.
- MADEIRA, J. DA C. et al. Novel Pharmacological Properties of *Dinoponera quadriceps* Giant Ant Venom. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 9, p. 1607–9, set. 2015.
- MARCHIORI, E. Chagas disease : a tropical infection of interest to the radiologist. **Radiol Bras**, v. 49, n. 6, p. 2016–2017, 2016.
- MARIANO, D. O. C. et al. Bottom-Up Proteomic Analysis of Polypeptide Venom Components of the Giant Ant *Dinoponera quadriceps*. **Toxins**, 2019.
- MEIRA, C. S. et al. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v.22, p969-974, jul. 2015.
- MENEZES, R. R. P. P. B. **Efeito tripanocida do (-)-alfa-bisabolol sobre a cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. 2017. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2017.
- MONTEIRO, M. L. **Efeito antichagásico de peptídeos derivados da hemocianina do camarão *Penaeus monodon***. 2019. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2019.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465–481, 24 fev. 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

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.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – **OPAS/OMS** Brasil, 2020. Disponível em: <http://www.paho.org>. Acesso em 05 jan. 2021.

OLIVEIRA, M. DE F. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.

PAIVA, R. V. S.; BRANDÃO, C. R. F. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera Roger* (Hymenoptera Formicidae). **Ethology Ecology & Evolution**, v. 7, n. 4, p. 297–312, out. 1995.

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.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003540, 13 fev. 2015.

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 576–589, 31 out. 2012.

ROCHA, L. Q. et al. *Dinoponera quadriceps* venom as a source of active agents against *Staphylococcus aureus*. **Toxicon**, v. 189, p. 33–38, 2021.

RODRIGUES, J. H. DA S. et al. A Quinoxaline Derivative as a Potent Chemotherapeutic Agent, Alone or in Combination with Benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85706, jan. 2014.

SABIÁ JÚNIOR, E. F. et al. Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against protozoan parasites. **Toxins**, 2019.

SALDITT, T.; LI, C.; SPAAR, A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1483–1498, 2006.

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.

SOUSA, P. L. et al. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 213–6, 31 out. 2012.

SUN, Y.; SUN, Tzu-Lin.; HUANG, H. W. Mode of Action of Antimicrobial Peptides on *E. coli* Spheroplasts. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 1, p. 132–9, 12 jul. 2016.

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

TORRES, A. F. C. et al. Transcriptome analysis in venom gland of the predatory giant ant *Dinoponera quadriceps*: insights into the polypeptide toxin arsenal of hymenopterans. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87556, 31 jan. 2014.

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

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

ZINGALES, B. et al. Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 811–814, 1997.

YAVARI, B. et al. The potential use of peptides for cancer treatment. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, 11 jan. 2018.