UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA BEATRIZ CAMPOS MARCOSSI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS PEPTÍDEOS ANGIOTENSINA 1-7 E ALAMANDINA 1-5 NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

OURO PRETO

2025

Ana Beatriz Campos Marcossi

Avaliação do potencial terapêutico dos peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina 1-5 na infecção *in vitro* por *Trypanosoma cruzi*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: André Talvani

Coorientadora: Flávia de Souza Marques

OURO PRETO

2025

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIENCIAS EXATAS E BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Beatriz Campos Marcossi

Avaliação do potencial terapêutico dos peptídeos angiotensina 1-7 e alamandina 1-5 na infecção *in vitro* pelo *Trypanosoma cruzi*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto

como requisito parcial para obtenção do título de bacharela em Ciências Biológicas

Aprovada em 29 de Agosto de 2025

Membros da banca

Prof. André Talvani - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Flávia de Souza Marques - coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Laser Antônio Machado de Oliveira - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Tamiles Caroline Fernandes Pedrosa - Universidade Federal de Ouro Preto

O Prof. André Talvani, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 29/08/2025.

Documento assinado eletronicamente por **Andre Talvani Pedrosa da Silva**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/09/2025, às 07:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 , informando o código verificador **0980285** e o código CRC **33EC9DDC**.

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Pela conclusão desta etapa na Universidade Federal de Ouro Preto agradeço primeiramente à Deus, que me colocou no meio de pessoas especiais que me ensinaram tudo que sei e que me amparou em todos os momentos difíceis.

Agradeço e dedico este trabalho à minha família. Aos meus pais, Aureliane e Marcos, que fizeram de tudo para me auxiliar aqui e que sempre acreditaram em mim. Ao meu irmão, Marco Aurélio, que me viu conquistar a vaga na universidade, mas que infelizmente não estará aqui para me ver sair com um diploma. Eu amo vocês e não estaria nesta posição sem a ajuda de vocês.

Agradeço aos meus professores ao longo do curso e aos meus amigos de turma do 21.2. Vitória, minha duplinha de todos os trabalhos e que aguentou muita reclamação durante esses anos de curso, Duda, Clara, Lorena e Leandra, obrigada por compartilharem essa jornada comigo.

Ao meu orientador André Talvani, que é um exemplo de orientador atencioso com seus alunos, por ter me dado a chance de trabalhar em um laboratório tão acolhedor. Ao LABIIN, que me mostrou o caminho da pesquisa por meio de pessoas boas que me ensinaram tudo. À Flávia, que me auxiliou em todo o processo de escrita. À Tamiles, que nunca soltou minha mão e nem me abandonou mesmo quando tudo estava dando errado e que me permitiu ver a ciência com seus olhos, além de me ensinar tudo sobre cultura de células. Aos meus colegas de IC, em especial à Natiele, que compartilhou os ‘apertos’ comigo rsrs.

Às minhas amigas Carol e Gabi, que mesmo de longe sempre estiveram lá por mim, desde 2017, vocês são tudo para mim. Ao meu namorado, Caio, que nunca me deixou desistir e sempre me apoiou nos meus sonhos, te amo.

Agradeço ao prof. Robson Augusto Souza dos Santos e sua aluna de pós-doutorado Amanda de Sá Martins de Bessa do laboratório de hipertensão da UFMG por proporcionarem uma parceria conosco ao ceder os peptídeos e assim tornando possível este trabalho.

Por fim, agradeço à UFOP por me dar essa chance de aprender com os melhores. Agradeço também aos órgãos de fomento CNPq e FAPEMIG (projeto APQ-02511-22) pelo auxílio financeiro às nossas pesquisas e pela disponibilização de bolsas.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito intracelular obrigatório flagelado capaz de infectar mamíferos, o que gera uma resposta inflamatória exacerbada e pode desencadear agravamentos no quadro do hospedeiro. Peptídeos presentes no sistema renina-angiotensina, como a Angiotensina 1-7 e a Alamandina 1-5, possuem mecanismos de regulação fisiológica do sistema cardiovascular e de modulação da resposta inflamatória. Devido a isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico destes peptídeos na infecção por *T. cruzi* em células da linhagem Vero. A metodologia utilizada consistiu na realização do ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas, visando encontrar o valor da concentração dos peptídeos que reduzam a viabilidade celular em 50% (CC50), para isso foram testadas 8 concentrações de cada peptídeo. Os ensaios sinalizaram valores de CC50 promissores e considerados pouco citotóxicos às células. Para a Angiotensina 1-7 foram observados valores de 296,69 uM no tempo de 24h e 393 uM no tempo de 48h. Para Alamandina 1-5 foram observados valores de 401,92 uM no tempo de 24h e 487 no tempo de 48h. Conclui-se que os peptídeos não são considerados citotóxicos às células e, portanto, apresentam baixo risco de causar efeitos adversos no individuo infectado. Como perspectivas futuras, tem-se como objetivos testar a atuação dos peptídeos em células infectadas por *T. cruzi* e após concluir a fase *in vitro*, iniciar pesquisas em modelos animais.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, peptídeos do sistema renina-angiotensina, citotoxicidade, Angiotensina 1-7, Alamandina 1-5

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is an obligate intracellular flagellated parasite capable of infecting mammals, which triggers an exacerbated inflammatory response and may worsen the host's clinical condition. Peptides from the renin–angiotensin system, such as Angiotensin 1–7 and Alamandine 1–5, possess physiological regulatory mechanisms of the cardiovascular system and modulatory effects on the inflammatory response. Therefore, the aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of these peptides during T. cruzi infection in Vero cells. The methodology consisted of performing the MTT assay at 24 and 48 hours, in order to determine the peptide concentration that reduces cell viability by 50% (CC50). Eight concentrations of each peptide were tested. The assays revealed promising CC50 values, which were considered to be of low cytotoxicity to the cells. For Angiotensin 1–7, values of 296.69 µM at 24h and 393 µM at 48h were observed. For Alamandine 1–5, values of 401.92 µM at 24h and 487 µM at 48h were observed. However, the 24h values were taken into account, since at this time point the possibility of interferences leading to less reliable results is lower. In conclusion, the peptides are not considered cytotoxic to the cells and, therefore, present a low risk of causing adverse effects in the infected individual. As future perspectives, we aim to test the activity of these peptides *in T. cruzi*-infected cells and, after completing the in vitro phase, to initiate studies in animal models.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, renin–angiotensin system peptides, cytotoxicity, Alamandine 1-5, Angiotensin 1-7

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos crônicos notificados em 2023.....12
Figura 2: Ciclo de vida de *T.cruzi*.....13
Figura 3: Resultados obtidos com o MTT.....22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....9

2. REFERENCIAL TEÓRICO.....10

2.1 Tripanossomíase americana.....10

2.1.1 Epidemiologia da doença de Chagas.....11

***2.1.2 Trypanosoma cruzi*.....12**

2.2 Resposta imune do hospedeiro.....14

2.3 Quimioterapia anti-*T. cruzi*.....15

2.4 Angiotensina 1-7.....15

2.5 Alamandina 1-5.....16

3. JUSTIFICATIVA.....17

4. OBJETIVOS.....18

5. METODOLOGIA.....19

5.1 Células VERO.....19

5.2 Ensaio de MTT.....19

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....21

6.1 Ensaio de MTT.....21

7. CONCLUSÃO.....23

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....24

1. INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, também chamada de doença de Chagas é uma doença parasitária causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi.* Este protozoário intracelular possui ciclo de vida compartilhado entre o vetor (triatomíneo) e os hospedeiros vertebrados (Loshouarn; Guarneri, 2024). A doença de Chagas é caracterizada por duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase crônica se estabelece após a fase aguda, podendo permanecer assintomática por anos e, em parte dos casos, evolui para formas clínicas graves.

A tripanossomíase é caracterizada por uma maior prevalência na América Latina, sendo endêmica em 21 países (OMS, 2015). No Brasil, entre os anos de 2000 a 2019 foram emitidos 95.000 atestados de óbito por doença de Chagas crônica (Cucunubá et al., 2024). Pode-se dizer que estas mortes ocorreram, principalmente, pela falta de diagnóstico prévio, tornando a eficácia do tratamento reduzida em fases crônicas.

O diagnóstico desta doença é realizado, principalmente, por exames laboratoriais e por ensaios imunoenzimáticos (Rey, 2008). Contudo, com uma combinação entre a falta de conhecimento da população acerca desta parasitose e a sintomatologia ausente da doença, o diagnóstico tem sido dificultado. O tratamento atualmente é realizado pelos fármacos benznidazol e nifurtimox (no Brasil, é utilizado somente o benznidazol), que são considerados tóxicos, além de possuírem eficácia variável, em detrimento da resistência relativa às diferentes populações genéticas do parasito (Inst et al., 2010).

A infecção por *T. cruzi* gera uma resposta inflamatória sistêmica e focal (tecidos), com presença majoritária de células com padrão de resposta Th1 e de citocinas dependentes de vias de sinalização intracelular como NF-kB e MAPK (Kayama; Takeda., 2010). A resposta do sistema imunológico ao *Trypanosoma cruzi* é fundamental, uma vez que a inflamação desempenha papel essencial na tentativa de eliminar o parasita. No entanto, a persistência dessa resposta inflamatória pode resultar em destruição tecidual, acarretando danos funcionais e estruturais a diferentes órgãos, especialmente ao coração

Portanto, neste trabalho, foram investigados como potenciais alvos terapêuticos os peptídeos angiotensina 1–7 e alamandina 1–5, ambos integrantes do sistema renina–angiotensina. Esses peptídeos desempenham papel essencial na regulação de mecanismos fisiológicos do sistema cardiovascular — principal alvo da infecção por *T. cruzi* — e, adicionalmente, apresentam capacidade de modular a resposta inflamatória por meio da

redução de mediadores como TNF e IL-1β, conferindo-lhes potencial efeito anti-inflamatório (Santuchi et al., 2019).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tripanossomíase americana

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, foi descoberta por Carlos Chagas no ano de 1909 em território brasileiro. Sua descoberta é considerada a mais completa da área médica, onde um único indivíduo, em vida, descreveu o agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, o ciclo de vida e as formas evolutivas do parasito, além de seus hospedeiros invertebrados (Coura; Borges-Pereira, 2010).

A forma clássica de transmissão é a transmissão vetorial. Ela ocorre quando triatomíneos, ao realizar o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados, gera uma ruptura da integridade da pele, deposita seus excrementos e gera uma reação de hipersensibilidade na pele do hospedeiro, o que torna possível a penetração de formas metacíclicas (formas infectantes encontradas no intestino do triatomíneo). Contudo, a infecção também pode ocorrer por meio de transfusões de sangue ou transplante de órgãos contaminadas com o parasito, por meio da transmissão vertical (transmissão materno-fetal), acidentes laboratoriais com o manuseio de amostras contendo o parasito e por meio da ingestão de alimentos contaminados (De Nazaré; Lisboa De Castro, 2011).

A fase aguda é caracterizada, muitas vezes, por uma sintomatologia inespecífica, em grande parte dos casos leves, o que torna difícil o processo de diagnóstico uma vez que os sintomas são comuns a outras doenças. É possível haver eventos graves nesta fase, com quadros de miocardite (10% dos casos) ou meningoencefalite, em crianças. Se o indivíduo não evoluir a óbito na fase aguda, ou ainda, se não for diagnosticado e tratado corretamente, evolui para a fase crônica da doença. Nesta fase, 70% dos pacientes podem permanecer assintomáticos por muitos anos, caracterizando a forma indeterminada da doença. No entanto, 30% dos pacientes podem desenvolver quadros sintomáticos que variam entre leves, moderados e graves, podendo acometer o coração (forma cardíaca), o trato digestório (principalmente esôfago e cólon – forma digestiva), ou ainda acometendo simultaneamente o coração e o trato digestório (forma mista) (Dias, 1995).

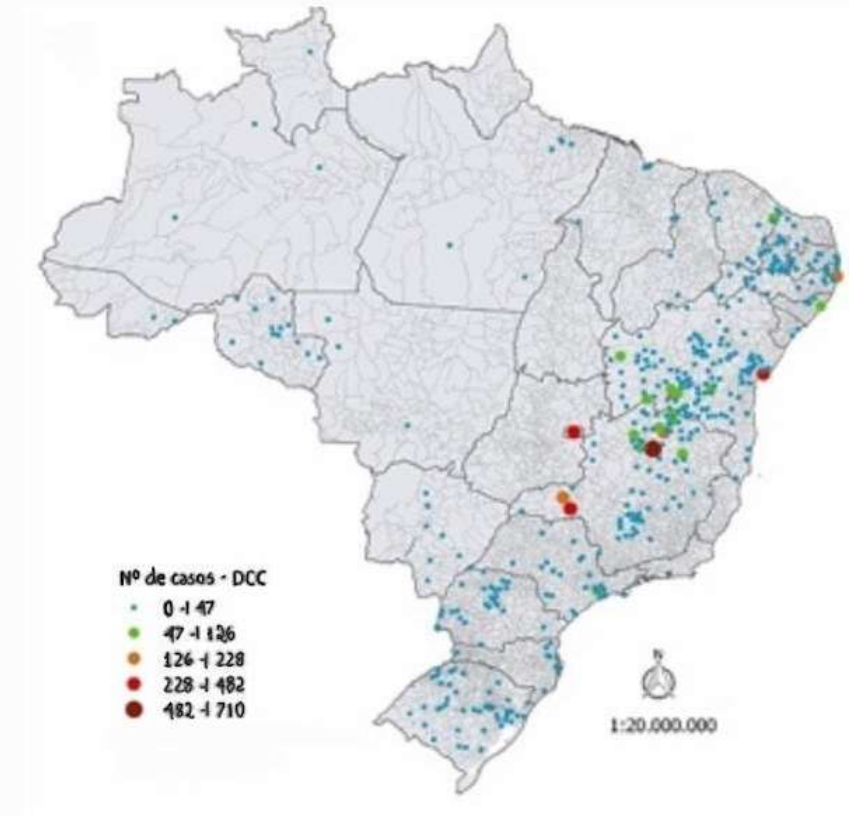
O diagnóstico da tripanossomíase é feito a partir de análises laboratoriais, onde na fase aguda recomenda-se o uso de exames parasitoscópicos do sangue, ou a realização de ensaios de imunofluorescência indireta e hemaglutinação, e na fase crônica os mais indicados são reações imunoenzimáticas (ELISA) e imunofluorescência (Rey, 2008). Atualmente, o tratamento para esta doença é feito por duas medicações: o benznidazol e o nifurtimox; contudo por possuírem eficácia variável na fase crônica da doença, efeitos colaterais diversos (Inst et al., 2010).

2.1.1 Epidemiologia da doença de Chagas

A epidemiologia da tripanossomíase americana é moldada por diferentes fatores, tais como as condições ambientais da região, a biologia do vetor e do hospedeiro e, principalmente, por fatores socioeconômicos, uma vez que acomete, em sua maioria, pessoas em situação de vulnerabilidade social, ou seja, que não possuem condições ideais de moradia, saneamento, e acesso limitado à saúde pública (Rassi; Rezende, 2012). Devido a este fator, a doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma Doença Tropical Negligenciada. Mundialmente, estima-se que 8 a 10 milhões de pessoas tenham sido infectadas pelo *T. cruzi,* resultando em aproximadamente 10.000 mortes por ano (Mills, 2020). Apesar de ser uma doença disseminada em todos os continentes, sua prevalência é maior na América Latina, que possui 21 países com áreas endêmicas da doença (OMS, 2015).

No Brasil, a degradação ambiental tem facilitado a migração dos vetores do *Trypanosoma cruzi* para áreas urbanas, resultando na sobreposição dos ciclos de transmissão silvestre e doméstico da doença de Chagas. Além disso, após o controle da transmissão vetorial, a transmissão pela via oral tornou-se a principal forma de transmissão da doença no Brasil, sendo caracterizada pela ingestão de alimentos, como o açaí, contaminados com formas tripomastigotas do parasito, onde os alimentos podem ser triturados juntamente com o triatomíneo infectado (BRASIL, 2023). Atualmente, há uma falha na vigilância de casos da doença, em ambas as fases, onde na fase aguda são impactados casos relacionados à infecção por via oral, e na fase crônica a falta de diagnóstico precoce de pacientes chagásicos leva à falha do tratamento. Como resultado, entre os anos de 2000 e 2019, o Brasil emitiu 95.000 atestados de óbito com a causa de doença de Chagas crônica (Cucunubá et al., 2024). A figura 1 demonstra a variação de número de casos crônicos notificados no ano de 2023 por todo o país.

Figura 1: Número de casos crônicos notificados em 2023. A figura representa os casos notificados da doença em sua forma crônica, onde os pontos em azul representam 0 a 47 casos naquele dado local, os pontos em verde representam de 47 a 126 casos, os pontos em laranja representam de 126 a 228 casos, os pontos em vermelho representam de 228 a 482 casos e os pontos em vinho representam de 482 a 710 casos notificados.



Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2023)

O estado de Minas Gerais é considerado como um dos estados endêmicos da doença de Chagas, uma vez que no ano de 2020 notou-se uma alta frequência de vetores infectados da doença, ou seja, há um grande risco de transmissão vetorial (Cruz et al., 2024). Contudo, em uma área situada no norte do estado que é considerada endêmica notou-se que mesmo com a eliminação do principal vetor *(Triatoma infestans)* desta região os casos perduraram, possivelmente devido a transmissão por outras vias, como a via oral (Faria et al., 2021).

2.1.2 Trypanosoma cruzi

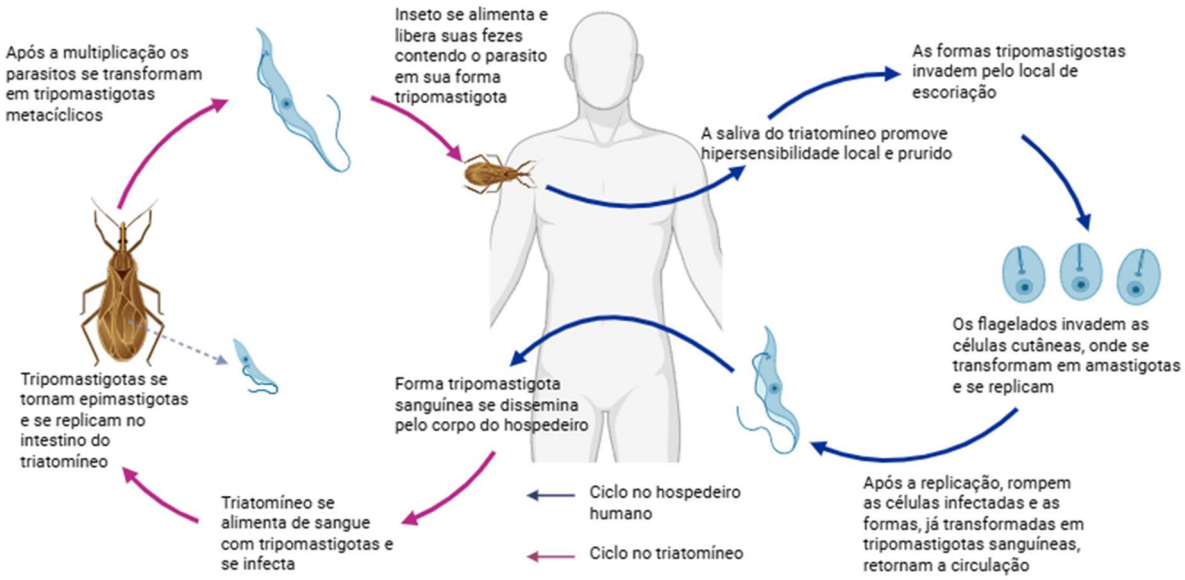
O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório flagelado da família *Tryponosomatidae* do grupo de protozoários (Chagas, 1909). Em seu ciclo biológico há

a participação do hospedeiro vertebrado (mamíferos) e do hospedeiro invertebrado (triatomíneo), sendo este último o vetor da doença. Além disso, sabe-se que este parasito possui diferentes formas evolutivas, sendo elas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (metacíclicas e sanguíneas) (Loshouarn; Guarneri, 2024).

O ciclo de vida é iniciado a partir do repasto sanguíneo do triatomíneo em um mamífero já infectado, no qual o inseto suga o sangue contendo formas tripomastigotas (Coura; Borges-Pereira, 2010). No inseto, as formas tripomastigotas se transformam em esperomastigotas e, sucessivamente, em epimastigota havendo posterior direcionamento ao intestino do inseto, onde se replicam. Após a replicação, formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, tornando-se as principais formas infectantes para hospedeiros mamíferos (Rey, 2008).

A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre quando este inseto infectado se alimenta do sangue e simultaneamente defeca na pele deste hospedeiro. Juntamente às suas excretas são liberadas as formas infectantes do parasito, que penetram o hospedeiro vertebrado por meio de lesões na pele ou na mucosa adjacente à picada (Rassi; Marcondes de Rezende, 2012). Após invadir as células do hospedeiro mamífero, o parasito se diferencia em formas amastigotas e se replica sucessivamente por divisão binária, levando ao aumento da carga parasitária no citoplasma desta célula. Após vários ciclos de replicação, o parasito se diferencia em tripomastigotas sanguíneas rompendo a célula e sendo liberados na corrente sanguínea, podendo infectar outras células (Coura; Borges-Pereira, 2010). Neste momento, é possível a transmissão para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo. A figura 2 demonstra o ciclo de vida do parasito.

Figura 2: Ciclo de vida de *T. cruzi*. A imagem descreve todo o processo do ciclo de infecção do parasito, no hospedeiro vertebrado e no vetor (representados pela seta azul e rosa, respectivamente). O triatomíneo se alimenta de sangue contaminado por tripomastigotas sanguíneas, e em seu intestino essa forma se modifica em epimastigotas, formas replicativas. Após este processo, se modificam em tripomastigotas metacíclicos, e com o processo de alimentação do inseto e liberação de fezes as tripomastigotas infectam o hospedeiro. No hospedeiro, formas tripomastigotas metacíclicas invadem as células e se tornam amastigotas, formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Após a replicação, rompem as células e invadem a corrente sanguínea, em sua forma tripomastigota sanguínea, dando ínicio a um novo ciclo, ou infectando outras células.



Fonte: autoral

2.2 Resposta imune do hospedeiro

A infecção por *T. cruzi* leva o hospedeiro a desenvolver uma resposta inflamatória complexa e multifatorial, podendo variar de acordo com a fase da infecção e/ou o grau doença. A resposta inflamatória é um mecanismo de defesa ao parasito e uma das vias dessa resposta é a ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), onde um destes receptores é o receptor do tipo Toll (TLRs), em células do sistema imune inato (Chen et al., 2018). A ativação destes receptores leva à ativação de cascatas de sinalização intracelular, utilizando vias como NF-kB e MAPK, e estas contribuem para a geração de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-y, TNF, IL-6, IL-12, e estimulam células do sistema imune, como linfócitos Th1 e macrófagos (Kayama; Takeda., 2010).

As citocinas são essenciais para ativar mecanismos contra patógenos pela indução da enzima produtora de óxido nítrico em macrófagos, uma vez que espécies reativas de nitrogênio podem levar a destruição do patógeno (Chen et al., 2018). Além disso, as citocinas são essenciais para a ativação celular e alteração de padrões da resposta inflamatória. Entretanto, mesmo na fase aguda o parasito dispõe de mecanismos de evasão do sistema imune, e dentre estes mecanismos destacam-se a manipulação de ativação dos macrófagos, onde o parasito invade a célula, regula a produção de citocinas e inibe a via de produção de óxido nítrico, e a “camuflagem” do reconhecimento do sistema imune, uma vez que os compostos da superfície do *T.cruzi* (mucinas glicosiladas) dificultam o reconhecimento do parasito e reduz a eficiência da atuação de anticorpos

(Cardillo et al., 2015). Com a evasão do parasito, a infecção persiste e progride para a fase crônica, com baixa parasitemia.

2.3 Quimioterapia anti - *T.cruzi*

O tratamento para a infecção por *Trypanosoma cruzi* é realizado por meio de dois fármacos, conhecidos como nifurtimox e benznidazol. Apesar de serem os únicos compostos disponíveis para o tratamento da doença, ambos possuem diversos efeitos colaterais como náusea, vômitos, perda de peso, reações de hipersensibilidade e neuropatias periféricas (Arrúa et al., 2019).

O benznidazol [2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida] possui um desempenho biofarmacêutico aceitável, com dose recomendada de 5 a 7 mg/kg em adultos e 5 a 10 mg/kg em crianças de até 12 anos. O medicamento deve ser ingerido oralmente, duas vezes ao dia por 30 a 60 dias. O nifurtimox [5-nitrofuranil (3-metil-4-(5′-nitrofurfurilidenoamina) tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido)] possui maior eficácia, mas não total, na fase aguda. Sua dosagem é de 8 a 10 mg/kg, para todas as idades, e deve ser ingerido todos os dias durante um período de 90 a 120 dias (Rojo et al., 2014). Contudo, o medicamento nifurtimox não é utilizado no Brasil devido a considerações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), como a ausência de estudos acerca de sua segurança.

Estes fármacos têm apresentado ações sob a resposta imune do hospedeiro infectado por *T. cruzi*, uma vez que aproximam o padrão de expressão da resposta imunológica dos infectados ao padrão de indivíduos saudáveis (Gómez et al., 2024). Contudo, apesar desta imunoregulação parcial, a destruição de *T. cruzi* em conjunto com um controle da resposta imune poderia contribuir para a mitigação do dano tecidual, em especial ao miocárdio (Gutiérrez et al., 2011). Por isso, em paralelo à busca por novas terapias anti-*T. cruzi*, têm-se buscado também, terapias alternativas que possam controlar a resposta inflamatória e reduzir os danos cardiovasculares associados à infecção por *T. cruzi*. Dentre estes alvos, destacam-se os peptídeos vinculados ao sistema renina-angiotensina, angiotensina 1-7 e alamandina 1-5 (Qaradakhi et al., 2016).

2.4 Angiotensina 1-7

A angiotensina 1-7 é um peptídeo bioativo, formado pela ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que converte a angiotensina 2 em angiotensina 1-

7, e que possui um receptor específico, chamado de Mas (Qaradakhi et al., 2016). Todos estes componentes formam o eixo ACE2/Ang-(1-7)/Mas, que é uma ramificação do sistema renina-angiotensina (SRA). A via clássica de RAS dispõe de efeitos pró-inflamatórios e vasoconstritores, contudo, o eixo ACE2/Ang-(1-7)/Mas dispõe de efeitos contrários à via clássica, podendo induzir a vasodilatação e a ação anti-inflamatória através da ligação entre o receptor Mas e o peptídeo (Passos-Silva, Verano-Braga, Santos, 2013).

A ação do eixo ACE2/Ang-(1-7)/Mas pode auxiliar através do seu potencial anti-inflamatório, reduzindo a quantidade de citocinas pró-inflamatórias e aumentando citocinas como a IL-10, e de sua regulação da via de óxido nítrico, reduzindo o estresse oxidativo nas células (Alenina; Dos Santos, 2015). O potencial de atenuação da inflamação por meio da Angiotensina 1-7 está relacionado à ativação de vias simpáticas dependentes do receptor Mas. Além de promover mitigação da resposta inflamatória, a Angiotensina 1-7 demonstrou atuação na restauração da reatividade vascular, que pode ser prejudicada em indivíduos infectados por *T. cruzi* (Figueiredo et al., 2020).

2.5. Alamandina 1-5

A alamandina (1-5) é outro peptídeo vinculado ao sistema renina-angiotensina (SRA) de mamíferos e é formado a partir da alamandina. Sua formação ocorre pela descarboxilação da angiotensina-(1-7) e pela ação da enzima conversora de angiotensina que cliva a alamandina. Este peptídeo atua na modulação da função cardíaca e vascular, na redução da pressão arterial e na diminuição da contratilidade cardíaca, através da ativação de receptores protetores associados ao sistema renina-angiotensina, sendo um destes receptores o receptor MrgD, onde estes estimulam a produção de óxido nítrico e ativam vias metabólicas, levando à regulação da vasodilatação (Qaradakhi et al., 2016).

A atuação da alamandina (1-5) sobre os receptores presentes no eixo protetor do sistema é de interesse em estudos acerca da doença de Chagas devido ao seu potencial anti-inflamatório, onde sua ação consiste na inibição de vias inflamatórias como a via NF-kB, e na sua ação vasodilatadora. Além disso, o peptídeo pode ser viável em tratamentos de casos graves, uma vez que reduz a contratilidade cardíaca o que pode ser benéfico à pacientes com cardiomiopatia chagásica (Dias et al., 2024). Acredita-se que a alamandina possui maior potencial na modulação imunoinflamatória em tecidos cardíacos sob condições patológicas, podendo ser um potencial tratamento para redução da inflamação em quadros de infecção por *T. cruzi* (Barbosa et al., 2024).

3. JUSTIFICATIVA

A infecção por *T. cruzi* apresenta caráter inflamatório, causando danos estruturais e funcionais ao miocárdio, mediados pela resposta imune do hospedeiro contra o parasita. Diante das limitações terapêuticas dos fármacos atualmente disponíveis e do risco contínuo de progressão clínica associado à persistência da resposta imune mesmo após o tratamento, a investigação de novas estratégias capazes de mitigar os danos miocárdicos torna-se essencial.

Nesse contexto, os peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina 1-5 despertam interesse devido às suas propriedades cardioprotetoras. Esses peptídeos promovem regulação da vasodilatação e modulam respostas inflamatórias, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a de citocinas anti-inflamatórias. Com base nisso, o presente estudo visa avaliar a ação desses peptídeos inicialmente em cultura celular e, posteriormente, em modelos animais, com o objetivo de compreender seu potencial terapêutico na proteção do miocárdio infectado por *T. cruzi.*

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico dos peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina 1-5 na infecção *in vitro* por *T. cruzi*

4.2 Objetivos específicos

- Analisar a citotoxicidade em células Vero de peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina 1-5

5. METODOLOGIA

5.1 Células VERO

Para este estudo foram escolhidas as células VERO, que são células epiteliais derivadas do rim de macaco africano, da espécie *Cercopithecus aethiops*, amplamente utilizadas no ambiente de pesquisas, de forma majoritária em estudos envolvendo infecções virais e parasitárias uma vez que são estáveis às passagens e controláveis em ambientes *in vitro,* tornando-as ideais para o estudo de interação entre célula hospedeira e patógeno (Senpuku et al., 2025).

As células VERO são designadas para estudos de infectividade na infecção experimental *in vitro* pelo *T. cruzi* devido à alta taxa de adesão do parasito, em sua forma tripomastigota, à célula. A adesão ocorre devido a uma proteína presente na superfície do parasito, de aproximadamente 80 kDa, que se liga a receptores presentes na célula e através da emissão de sinais inicia o processo de internalização do parasito (Andrews et al., 1987). Por meio do mecanismo de adesão é possível visualizar a interação entre a célula e parasito, e consequentemente tornando possível estudos acerca de alvos terapêuticos.

5.2 Ensaio de MTT

Para a realização do ensaio foram utilizadas células da linhagem VERO previamente cultivadas em meio DMEM F12. O ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio] foi utilizado neste trabalho para avaliar a viabilidade celular após tratamento com os peptídeos, ou seja, para encontrar o valor de CC_{50} (valor da concentração do peptídeo que reduz a viabilidade celular em 50%). Para realização deste ensaio, o primeiro passo efetuado foi o plaqueamento das células em duas placas de 96 poços, onde cada poço continha 10.000 células suspensas. Com esta etapa concluída, as placas com as células foram colocadas em estufa de CO_2 por 24 horas.

Após a etapa de plaqueamento, foi realizado o tratamento destas células com os peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina 1-5. Foram testadas 8 concentrações (uM/L) dos peptídeos, que consistiram na mesclagem de meio DMEM e da solução estoque-mãe, que foi preparada a partir de 1 mg de peptídeo, 50 uL de DMSO e 950 uL de meio DMEM. As concentrações foram separadas por letras, de A a H, onde A = 0.3, B = 1, C = 3, D = 9, E = 27, F = 81, G = 243 e H = 724 e foram testadas em triplicata. Além das concentrações também foram adicionados às placas o controle positivo, constituído por meio DMEM com células, e o controle negativo, constituído por DMSO.

Seguido à etapa de tratamento, após 24 horas, foi retirado o tratamento da placa designada para a leitura após 24 horas. Sem a presença de líquidos na placa, foram colocados em cada poço 60 uL de MTT e submeteu a placa à estufa por 2 horas. Passadas as duas horas, a placa foi lida no equipamento TECAN no comprimento de onda 570 nm. Com a leitura efetuada, os valores de absorbância da luz foram submetidos a cálculos no Excel e posteriormente ao *GraphPad Prism*. O mesmo processo foi realizado com a segunda placa, que foi designada para leitura após o tempo de 48 horas da etapa de tratamento.

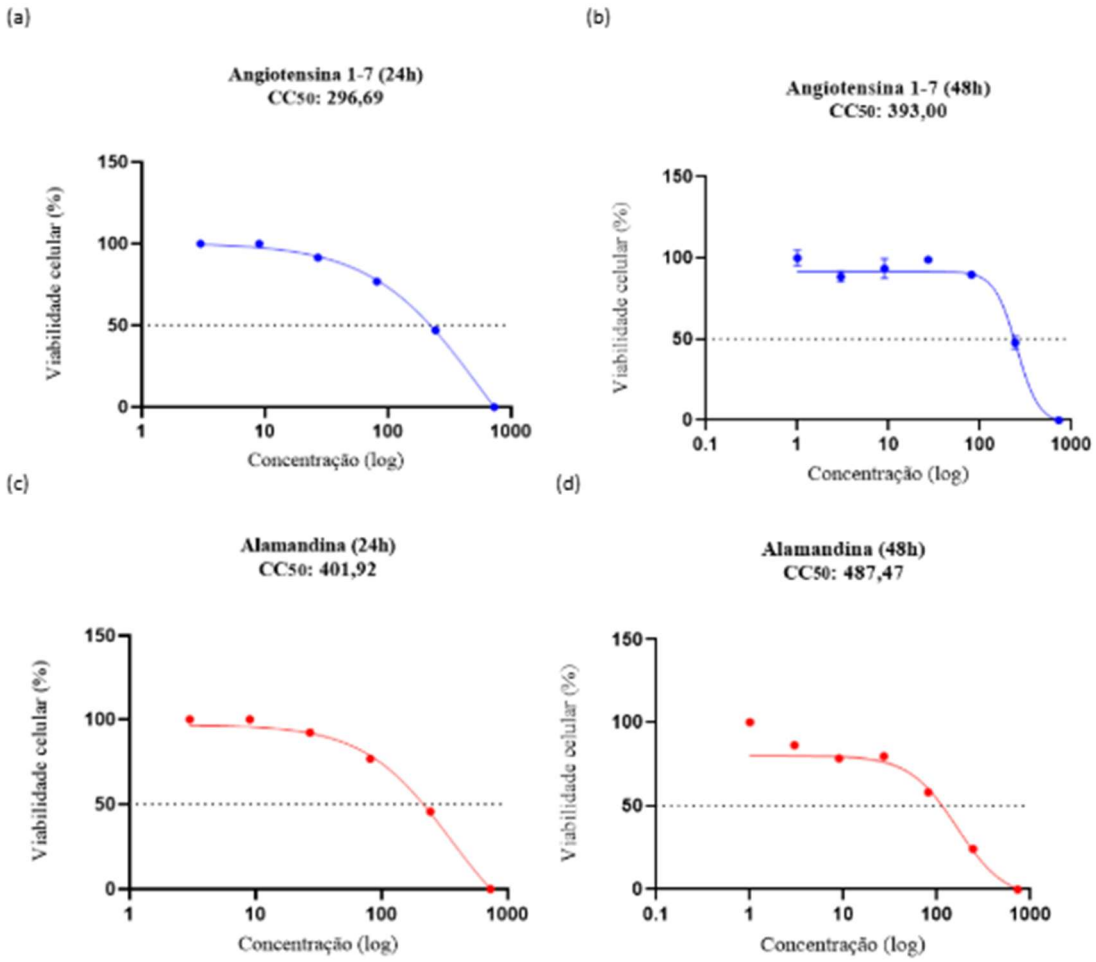
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ensaio de MTT

Os ensaios de MTT sinalizaram um valor de CC_{50} de 296,69 uM no tempo de 24 horas e de 393,00 uM no tempo de 48 horas para a Angiotensina 1-7. Ao avaliar a Alamandina 1-5, observou-se um valor de CC_{50} de 401,92 uM no tempo de 24 horas e de 487,47 uM no tempo de 48 horas.

A partir destes resultados, concluiu-se que os peptídeos avaliados apresentavam baixa citotoxicidade. Segundo a literatura, valores de CC_{50} acima de 100 uM em células da linhagem Vero são indicativos de que o peptídeo/composto possui segurança nas células de hospedeiros (Ivanov et al., 2020). Segundo Lautner e colaboradores, estes peptídeos apresentariam segurança às células de mamíferos por serem derivados de células presentes no corpo humano (Lautner et al., 2013). Em suma, ambos os compostos demonstraram ser promissores para testes futuros no contexto de infecção e tratamento da doença de Chagas.

Figura 3: Resultados obtidos com o MTT. (a) gráfico de viabilidade celular frente às concentrações de Angiotensina 1-7 com 24 horas de tratamento; (b) gráfico de viabilidade frente às concentrações de Angiotensina 1-7 com 48 horas de tratamento; (c) gráfico de viabilidade celular frente às concentrações de Alamandina 1-5 com 24 horas de tratamento; e (d) gráfico de viabilidade frente às concentrações de Alamandina 1-5 com 48 horas de tratamento. Cada gráfico indica o valor de CC_{50} para cada peptídeo em seu respectivo tempo de cultura.



Notou-se que o valor de CC_{50} após 48 horas foi superior ao valor encontrado em 24 horas, contudo, fatores como degradação parcial dos peptídeos em meio de cultura e mecanismos de adaptação e defesa das células contra a ligação com os peptídeos podem ser considerados aqui para esta variação entre os tempos de 24h e 48h (Marques et al., 2018). Tendo isso em vista, optou-se pelo valor de CC_{50} de 24 horas para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos, uma vez que neste tempo as interferências foram reduzidas possibilitando um resultado melhor para a avaliação e para a sequência dos testes deste trabalho.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclui-se, com base neste trabalho, que os peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina 1-5 apresentam baixa citotoxicidade e potencial como alvos terapêuticos para infecções por T. cruzi, devido às suas propriedades cardioprotetoras, incluindo a regulação da vasodilatação e a modulação de respostas inflamatórias. Futuramente, pretende-se avaliar sua ação sobre a infectividade e determinar o índice de seletividade in vitro, avançando posteriormente para experimentação em modelos animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENINA, Natalia; DOS SANTOS, Robson Augusto Souza. Angiotensin-(1-7) and Mas: A Brief History. *In*: The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS): Functional Aspects and Therapeutic Implications. *[S.l.]*: Elsevier Inc., 2015. p. 155–159.

ANDREWS, Norma W.; HONG, Kwang Sik; NOGUEIRA, Norma. *The interaction of a Trypanosoma cruzi surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion*. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam: Elsevier, v. 23, n. 2, p. 147–154, 1987.

ARRÚA, Eva C. *et al.* Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. Acta TropicaElsevier B.V., , 1 out. 2019.

BARBOSA, C. M. S. et al. Novel Insights into the Cardioprotective Effects of the Peptides of the Counter-Regulatory Renin–Angiotensin System. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 3, p. 871, 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Análise descritiva: um ano de implementação da notificação de doença de Chagas crônica no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023.

CARDILLO, Fabíola *et al.* Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection. Pathogens and DiseaseOxford University Press, , 1 dez. 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHEN, Linlin *et al.* Oncotarget 7204 www.impactjournals.com/oncotarget Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organsOncotarget. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget/>.

COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica, jul. 2010.

CRUZ, Dardiane Santos *et al.* Prevalence analysis of Chagas disease by age group in an endemic region of Brazil: possible scenario of active vectorial transmission. IJID Regions, v. 12, 1 set. 2024.

CUCUNUBÁ, Zulma M. *et al.* The epidemiology of Chagas disease in the Americas. *[S.l.: S.n.]*.

DIAS, JCP. (1995) 'Natural history of Chagas disease', *Arquivos brasileiros de cardiologia,* 65(4), pp. 359- 366.

DIAS, Melissa Tainan Silva et al. Identification and characterization of alamandine-(1-5), a new component of the Renin-Angiotensin System with unique properties. **bioRxiv**, [s.l.], 29 abr. 2024.

DE NAZARÉ, Maria; SOEIRO, C.; LISBOA DE CASTRO, Solange. Screening of Potential anti-Trypanosoma cruzi Candidates: In Vitro and In Vivo StudiesThe Open Medicinal Chemistry Journal. *[S.l.: S.n.]*.

FARIA, Angélica Rosa *et al.* Risk of Trypanosoma cruzi transmission in southern Minas Gerais, Brazil – Data from 2014 to 2020. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, v. 23, 1 jan. 2021.

FIGUEIREDO, D. et al. Central angiotensin-(1-7) attenuates systemic inflammation via activation of sympathetic signaling in endotoxemic rats. Brain, Behavior, and Immunity, v. 87, p. 641-654, 2020.

GÓMEZ, B. C. A. et al. Transcriptional modulation of cellular immune response genes following benznidazole treatment in chronic Chagas disease patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 14, p. 1439714, 2024.

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* Regulation of Trypanosoma cruzi-Induced Myocarditis by Programmed Death Cell Receptor 1. *Infect Immun*. 2011 May;79(5):1873–1881.

INST, Mem *et al.* Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. *[S.l.: S.n.]*.

INST, Mem *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/>.

IVANOV, Aleksandr V. *et al.* Methylene blue inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 56, n. 6, p. 106202, 2020.

KAYAMA, H. AND TAKEDA, K. (2010) 'The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection', *Microbes and infection,* 12(7), pp. 511-517.

LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 2013. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301077.

LOSHOUARN, Henri; GUARNERI, Alessandra A. The interplay between temperature, Trypanosoma cruzi parasite load, and nutrition: Their effects on the development and life-cycle of the Chagas disease vector Rhodnius prolixus. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 18, n. 2, 1 fev. 2024.

MARQUES, Camila et al. Disruption of proteostasis by natural products and synthetic compounds. *Marine Drugs*, v. 16, n. 4, p. 616, 2018. DOI: 10.3390/md16040616.

MILLS, Roger M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. American Journal of MedicineElsevier Inc., , 1 nov. 2020.

NUNES, João Paulo Silva *et al.* Inflammation and mitochondria in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Experimental Biology and MedicineSAGE Publications Inc., , 1 nov. 2023.

PASSOS-SILVA, D.G; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. Clinical Science, v. 124, n.7, p. 443-456, 2013.

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARCONDES DE REZENDE, Joffre. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infectious Disease Clinics of North America, jun. 2012.

REY, Luís. Parasitologia, 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. E-book. ISBN 978-85-277-2027-4.

ROJO, Gemma *et al.* Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on Trypanosoma cruzi ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. Acta Tropica, v. 132, n. 1, p. 112–118, 2014.

SANTUCHI, M. de C. et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages In Vitro and In Vivo. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, p. 1–11, 2019.

SENPUKU, Kota et al. *Development and characterization of MRC-5 and Vero cell-adapted enterovirus D68 strains for vaccine production*. Vaccine, [S. l.], v. 60, 127314, 2025.

QARADAKHI, T. et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine: Similarities and differences. *Pharmacological Research*, v. 111, p. 820–826, 2016.

World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly epidemiological record. 2015. n. 6, v. 90, p. 33-44. Disponível em: https://iris.who.int/ handle/10665/242316. Acesso em: 24 de maio de 2025.