

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FARMÁCIA E BIOQUÍMICA

ISABELLA PAULINO OTVOS

Uma nova abordagem utilizando a metodologia de phage display para a identificação de peptídeos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas.

São Paulo
2020

ISABELLA PAULINO OTVOS

Uma nova abordagem utilizando a metodologia de phage display para a identificação de peptídeos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas.

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo
2020

OTVOS, I. P. Uma nova abordagem utilizando a metodologia de phage display para a identificação de peptídeos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo José Giordano, pela orientação, ensinamentos e paciência, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFUSP), pela oportunidade de realização do curso de graduação.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.¹

¹ De acordo com a portaria nº 206 de 4 de setembro de 2018 que dispõe sobre obrigatoriedade de citação da CAPES (FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR, 2018).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	albumina do soro bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ERK 1	quinase 1 regulada por sinal extracelular (do inglês, Extracellular signal-Regulated Kinase 1)
ERK 2	quinase 2 regulada por sinal extracelular (do inglês, Extracellular signal-Regulated Kinase 2)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
His	histidina
IPTG	isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilodaltons
LamG	laminina G
LB	meio de cultura lisogênico (do inglês, <i>Lysogenic Broth</i>)
Ni ²⁺ -NTA	níquel nitrilotriacético (do inglês, <i>Nickel-Nitrilotriacetic</i>)
PBS	solução salina tamponada com fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	reação de polimerase em cadeia (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG-NaCl	polietilenoglicol em cloreto de sódio
PepJ	peptídeo J
PKR2	proteína quinase regulatória 2 (do inglês, <i>Protein Kinase Regulatory 2</i>)
RCF	força centrífuga relativa (do inglês, <i>Relative Centrifugal Force</i>)
TB	meio de cultura enriquecido (do inglês, <i>Terrific Broth</i>)
TNF	fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

LISTA DE SIMBOLOS

%	porcento
mg	miligramma
kg	kilograma
TU	unidades transdutoras (do inglês, Transducing Units)
uL	microlitro
°C	graus Celsius
mM	milimolar
Abs	absorbância
M	molar
β	beta
OD	densidade óptica (do inglês, <i>Optical Density</i>)
ug	micrograma
RPM	rotações por minuto
h	hora
xg	gravidade
kD	kilodaltons
ng	nanograma
Pm	peso molecular

RESUMO

OTVOS, I. P. Uma nova abordagem utilizando a metodologia de phage display para a identificação de peptídeos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A doença de Chagas é causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi* e afeta milhões de pessoas no mundo. Essa enfermidade atinge principalmente indivíduos de baixas condições socioeconômicas e não apresenta interesse industrial em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos assumindo um importante problema de saúde pública no Brasil. Atualmente, o tratamento recomendado é constituído por apenas dois medicamentos, sendo eles o benznidazol e o nifurtimox, que apresentam toxicidade, resistência, efeitos adversos debilitantes e baixa eficácia na fase crônica. Em virtude disso, o desenvolvimento de alternativas farmacêuticas é necessário, principalmente na fase crônica, uma vez que essa ocasiona na redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida dos acometidos. Para tanto, o estudo das interações biomoleculares de alvos importantes para a invasão celular desse parasita é fundamental para a pesquisa de novas terapêuticas. Em trabalhos anteriores foi demonstrado a importância do domínio proteico Tc85-LamG na adesão e invasão celular do parasita devido a presença de uma região conservada contendo os motivos peptídicos FLY antiparalelo com o TS9. Neste presente trabalho, foram estudados possíveis ligantes do domínio Tc85-LamG utilizando a metodologia biotecnológica de phage display. Em adicional, foi realizado o levantamento bibliográfico referente ao emprego dessa metodologia na pesquisa em doença de Chagas. Na parte prática foi sintetizado o domínio Tc85-LamG para ser utilizado como alvo para a seleção de ligantes peptídicos por phage display. Ainda, foram realizados ensaios de ligação com o alvo Peptídeo J, que possui a mesma sequência de aminoácidos que a região FLY da Tc85-LamG, visando a identificação de ligantes específicos dessa região além da análise de ligantes do domínio como um todo. Os alvos foram incubados com as bibliotecas de fagos X6 e CX8C e os ligantes de maior afinidade foram recolhidos para a identificação das sequências dos peptídeos. Na parte teórica, foram utilizadas as bases de dados eletrônicas Pubmed e SciELO, para a coleta de informações dos periódicos cujos conteúdos envolveram aplicações desta metodologia, relacionada com a doença em questão, à luz do conhecimento atual. Os resultados mostraram que a metodologia do phage display é viável para a identificação de sequências peptídicas específicas. O presente trabalho contribuiu para a aplicação do phage display na busca de peptídeos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Phage Display. *Trypanosoma cruzi*. Peptídeos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	8
1.1.1 Ciclo de vida do parasita	10
1.1.2 Fisiopatologia	13
1.1.3 Farmacologia.....	14
1.1.4 Química Farmacêutica	15
1.1.5 Aspectos moleculares: domínio Tc85-LamG	17
1.2 A METODOLOGIA DO PHAGE DISPLAY	19
1.2.1 Biblioteca de fagos	21
1.2.2 Aplicações biotecnológicas	22
2 OBJETIVOS.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 PARTE PRÁTICA.....	25
3.1.1 Síntese do domínio Tc85-LamG.....	25
3.1.2 Phage display e panning	28
3.1.3 Identificação de peptídeos.....	30
3.1.4 Ensaios de ligação	31
3.2 PARTE TEÓRICA	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 RESULTADOS PRÁTICOS	33
4.1.1 Síntese do domínio Tc85-LamG.....	33
4.1.2 Phage display e panning	33
4.1.3 Análise de dados	34
4.2 RESULTADOS TEÓRICOS	36
4.2.1 Levantamento bibliográfico.....	36
4.2.2 Análise de dados	37
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

O agente etiológico da doença de Chagas, denominado de *Trypanosoma cruzi*, foi descoberto pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909. Atualmente, a doença é considerada endêmica principalmente na América Latina e em partes da América do Norte ficando conhecida como Tripanossomíase Americana. Entretanto, com o intenso fluxo migratório internacional, o número de casos em outros países aumentou tornando essa enfermidade um importante problema de saúde pública de preocupação global (RODRIGUES et al., 2014). Estimativas mostram que 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com *T. cruzi* e que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (WHO, 2020).

Em regiões endêmicas, o parasita é transmitido aos seres humanos principalmente por meio dos insetos hematófagos triatomíneos conhecidos popularmente como “barbeiros”. Esses vetores alimentam-se de sangue formando pequenas lesões cutâneas que servem como porta de entrada para as fezes do inseto contaminadas com o *T. cruzi*. Desse modo, o controle desses triatomíneos é uma importante forma de prevenção sendo visto como foco principal dos programas nacionais. O mecanismo mais conhecido de transmissão é o vetorial, no entanto, outros mecanismos de infecção são conhecidos tais como o transfusional, o transplantário, o vertical, o oral e o acidental.

A transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos foi reduzida drasticamente devido à obrigatoriedade da triagem sorológica na maioria dos países endêmicos. A transmissão congênita, também denominada de vertical, apresenta importância no Brasil em virtude da deficiência nas ações para prevenção dessa modalidade no país. A transmissão oral está vinculada ao consumo de alimentos contaminados com o *T. cruzi* estando associada geralmente a surtos. A transmissão acidental está relacionada a diferentes cenários como os laboratórios de pesquisa de triatomíneos ou com uso de animais contaminados, as atividades de captura de vetores

em áreas endêmicas e através de materiais contaminados (DIAS, 2016; RODRIGUES et al., 2014).

A doença de Chagas pode ser dividida em três fases clínicas: a aguda, a assintomática e a sintomática crônica. A fase aguda geralmente é assintomática sendo caracterizada pela resolução espontânea da enfermidade em 4 a 6 semanas. Entretanto, nos casos sintomáticos é perceptível um edema, conhecido como chagoma ou sinal de Romanã, que aparece quando a porta de entrada do *T. cruzi* ocorre nas regiões palpebral e periocular. Nessa fase, podem ser observados casos de mortes sendo ocasionados principalmente pela insuficiência cardíaca. Cabe ressaltar que no estágio agudo os sintomas são semelhantes aos das infecções infantis mais comuns de modo que em grande parte podem não ser percebidos em crianças. Mesmo em adultos, a fase aguda comumente passa despercebida.

Na fase assintomática, também denominada de indeterminada, que corresponde a cerca de 60 a 70% dos pacientes da fase aguda, não ocorrem os sintomas clínicos da doença; no entanto, existe a presença de anticorpos contra o *T. cruzi* no soro tornando possível a transmissão do parasita a outros seres humanos. A fase sintomática crônica, acometida pelos outros 30 a 40% dos pacientes da fase aguda, é caracterizada pelos problemas no sistema cardíaco e no sistema digestivo. Além disso, após 10 a 30 anos da infecção inicial, podem ocorrer manifestações tais como o megaesôfago e o megacôlon. Em virtude disso, o estágio crônico reflete em impactos sociais e econômicos negativos nos países nos quais existe alta incidência da doença (DIAS, 2016; RODRIGUES et al., 2014; MCADAM; SHARPE, 2010).

Alguns aspectos sociais para transmissão ao homem são as migrações humanas não controladas, a degradação ambiental, as alterações climáticas, a concentração da população em áreas urbanas e a precariedade de condições socioeconômicas tais como habitação, educação, saneamento e renda. As populações infectadas apresentam maior risco posto que existe maior exposição a outras doenças, condições e agravos; menor cobertura com medidas preventivas, maior probabilidade de adoecimento, menor acesso à rede de serviços de saúde, pior qualidade em serviços de atenção primária, menor probabilidade de receber tratamentos essenciais, menor

acesso a serviços de saúde de nível secundário e terciário, maior probabilidade de desenvolvimento de formas graves da doença e maior risco de evolução para óbito (DIAS, 2016). Desta forma, essa condição infecciosa é classificada como uma doença negligenciada, pois atinge principalmente pessoas de baixas condições socioeconômicas e não apresenta interesse industrial em pesquisa e desenvolvimento de fármacos, assumindo um importante problema de saúde pública no Brasil (THE LANCET, 2006; FERREIRA, 2012).

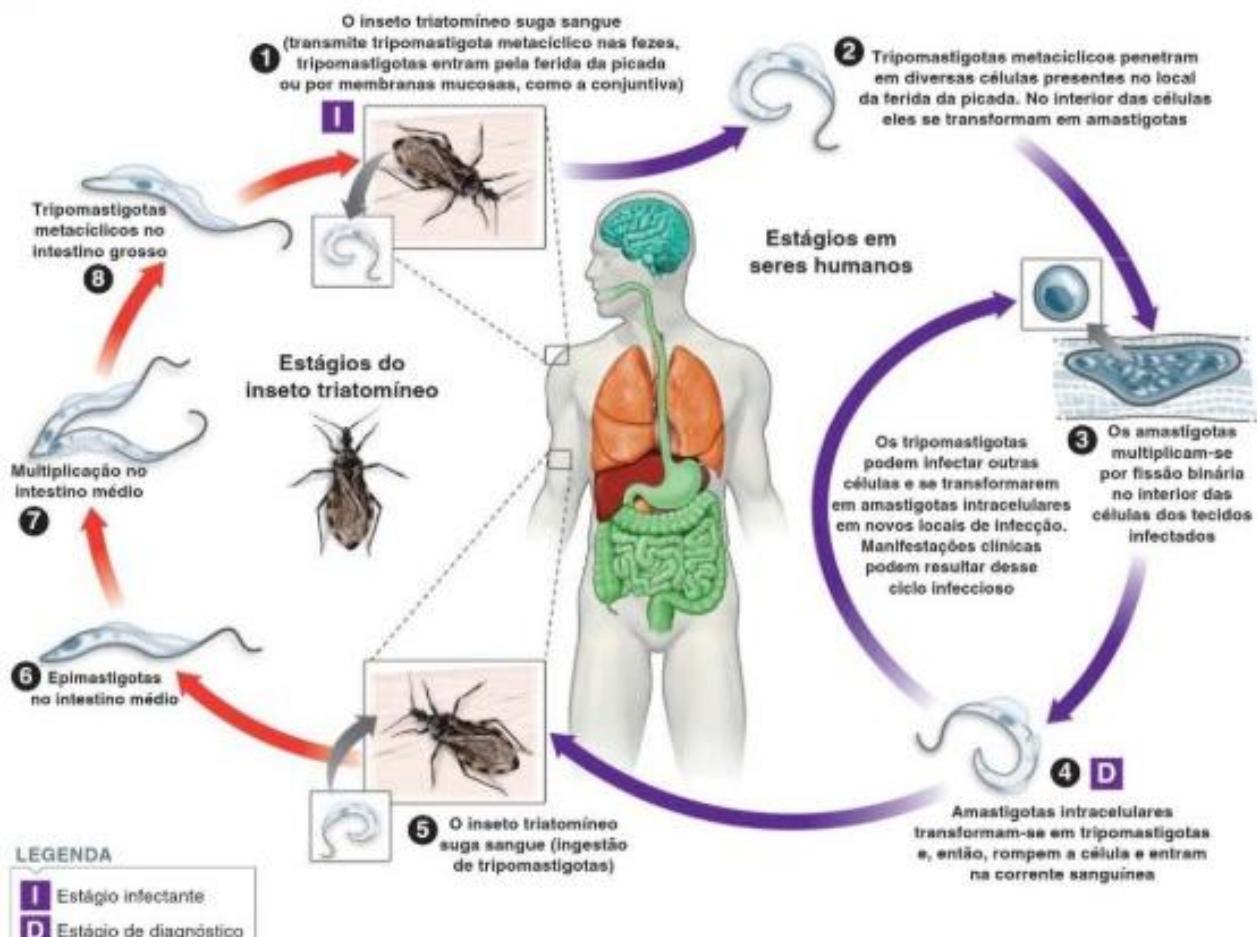
Atualmente, o tratamento recomendado é limitado sendo constituído oficialmente por apenas dois medicamentos, sendo eles o benznidazol e o nifurtimox. Ambos são utilizados na fase aguda da doença para a redução da gravidade dos sintomas bem como do encurtamento do curso clínico e duração da parasitemia detectável. Contudo, eles apresentam efeitos colaterais debilitantes para a saúde dos pacientes podendo acarretar na descontinuação da terapia. Além disso, existem variações regionais substanciais na eficácia devido às cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes. Em virtude disso, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas é necessário para essa debilitante doença. Ademais, a fase crônica merece destaque uma vez que esta ainda não apresenta um tratamento farmacológico adequado e está intimamente relacionado com a redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida (DIAS, 2016; RODRIGUES et al., 2014; LEMKE, 2013).

1.1.1 Ciclo de vida do parasita

O microorganismo *Trypanosoma cruzi* é um protozoário unicelular que apresenta três formas de desenvolvimento: a epimastigota, a tripomastigota e a amastigota. Essas formas fazem parte do ciclo de vida do parasita que apresenta estágios nos insetos triatomíneos e nos seres humanos e animais. A forma tripomastigota está presente tanto nos animais e seres humanos contaminados quanto nos insetos, sendo que nestes últimos ela é denominada de metacíclica. De maneira geral, o inseto ingere o sangue contendo os tripomastigotas de um hospedeiro contaminado (Figura 1). No intestino médio do vetor ocorre a diferenciação dos tripomastigotas em epimastigotas sendo que esta forma possibilita a multiplicação do parasita. No intestino grosso ocorre

a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos sendo que esta forma, presente nas fezes do inseto, possibilita a transmissão para o seres humanos por meio da sua entrada em regiões cutâneas lesionadas formadas durante a picada ou em regiões mucosas (LEVINSON, 2016).

Figura 1 - Ciclo de vida do protozoário *Trypanossoma cruzi* no inseto triatomíneo e em seres humanos.

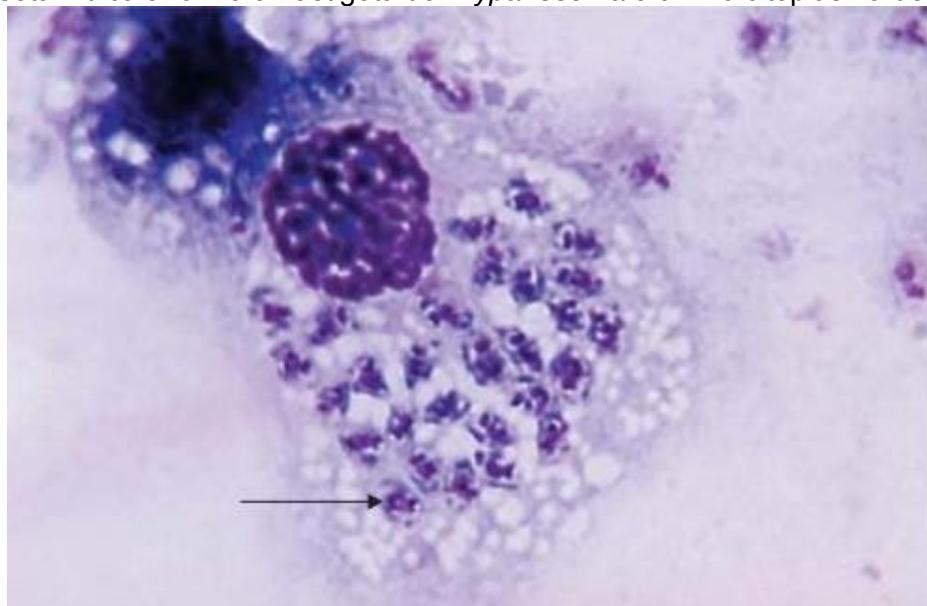


Fonte: Levinson (2016, p. 429).

Na corrente sanguínea, os tripomatigotas metacíclicos invadem o interior das células onde se diferenciam em amastigotas. Nesse estágio, ocorre a reprodução do parasita por fissão binária. Os amastigotas não possuem flagelo (Figura 2) e precisam transformar-se em tripomastigotas para possibilitar o rompimento celular e a liberação do parasita no sangue para a invasão em novos tecidos e para a manutenção do ciclo de infecção (SAKANARI; MC KERROW, 2014; LEVINSON, 2016).

Para o desenvolvimento da forma amastigota é necessário que o *T. cruzi*, na forma tripomastigota, tenha uma exposição curta ao conteúdo ácido do fagolisossomo. Para tanto, o parasita estimula um aumento na concentração de cálcio citoplasmático nos lisossomos das células hospedeiras promovendo a fusão desta organela com o fagossomo (MCADAM; SHARPE, 2010). Esse pH baixo, ativa as hemolisinas que rompem a membrana dos lisossomos de modo a liberar o parasita dentro do citoplasma celular. Nessa região ocorre a reprodução do *T. cruzi* como amastigotas arredondados que acabam desenvolvendo flagelos que rompem as células hospedeiras e são liberadas para a corrente sanguínea. Essa parasitemia possibilita a infecção dos vetores e a penetração do parasita no tecido cardíaco (MCADAM; SHARPE, 2010).

Figura 2 - A seta indica a forma amastigota do *Trypanosoma cruzi* no citoplasma de uma célula.



Fonte: Levinson (2016, p. 430).

1.1.2 Fisiopatologia

Na região cutânea de entrada das fezes contaminadas do parasita pode ser observado um nódulo inflamatório subcutâneo chamado de chagoma. A presença do sinal de Romanã, condição na qual ocorre inchaço em uma das pálpebras, é perceptível principalmente em crianças (LEVINSON, 2016; SAKANARI; MC KERROW, 2014).

A infecção direta do *T. cruzi* nas células miocárdicas é uma causa importante de miocardite e insuficiência cardíaca congestiva. A fase aguda da doença de Chagas apresenta dano cardíaco como resultado dessa invasão do parasita, no entanto, raramente é observada dilatação cardíaca progressiva e insuficiência cardíaca. Já, na fase crônica, o coração está tipicamente dilatado, arredondado e aumentado em tamanho e peso. Nessa situação, o dano cardíaco é resultado da ação direta do microrganismo, do processo inflamatório e da resposta imunológica induzida pelo *T. cruzi* que recruta células de defesa formando um infiltrado inflamatório evidente, embora o mecanismo exato ainda seja assunto de bastante discussão na literatura (BONNEY et al., 2019; PÉREZ-MOLINA, 2018). Ainda nessa fase, o parasita pode induzir uma resposta autoimune de modo que os anticorpos e células T do hospedeiro, que reconhecem determinadas proteínas do *T. cruzi*, reajam de forma cruzada com as células miocárdicas, células nervosas e proteínas extracelulares do hospedeiro (MARIN-NETO et al., 2007).

Outra possível condição em decorrência da doença de Chagas é a dilatação do cólon e do esôfago denominadas, respectivamente, de megacôlon e megaesôfago. Nessa situação os tripanossomas invadem a parede do intestino e destroem os nervos dos plexos mioentéricos de modo que ocorre a perda de tônus nessas regiões acometidas (MCADAM; SHARPE, 2010; LEVINSON 2016; SAKANARI; MC KERROW, 2014).

1.1.2 Farmacologia

A terapia farmacológica recomendada no tratamento da doença de Chagas é composta por dois medicamentos sendo eles o benznidazol e o nifurtimox. Apesar de ambos os fármacos apresentarem ação tripanocida contra as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, o benznidazol apresenta maiores vantagens em comparação com o nifurtimox (PHILIP; ROSENTHAL, 2017; WETZEL; PHILLIPS, 2015). Desta forma, o nifurtimox geralmente é utilizado em casos de intolerância ou falha terapêutica ao benznidazol apesar de ter sido verificada resistência cruzada entre os medicamentos. Ademais, a ação de ambos antiparasitários é afetada por algumas condições, tais como duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica do pacientes (DIAS, 2016).

O nifurtimox é um análogo nitrofurano que sofre redução gerando radicais de oxigênio intracelulares que são tóxicos para o parasita. Os tripanossomos são parasitas que carecem de enzimas capazes de degradar o peróxido de hidrogênio. Em virtude disso, são sensíveis aos fármacos nitroaromáticos devido à toxicidade associada. O mecanismo de ação do fármaco envolve primeiramente a formação de intermediários reduzidos, tais como os radicais nitroaril. Por sua vez, esses radicais podem ser oxidados acarretando na geração de ânions superóxidos que reagem com a água produzindo peróxido de hidrogênio sendo este um citotóxico. Cabe ressaltar que as células dos mamíferos apresentam proteção diante desses radicais de oxigênio através do sistema de enzimas antioxidantes tais como a catalase, a glutationa peroxidase e a superóxido dismutase (IVERS; RVAN, 2009; PHILLIPS, 2015). Entretanto, a toxicidade relacionada com o fármaco é comum devido à baixa especificidade de ações em vias bioquímicas definidas do parasita.

No geral, o nifurtimox apresenta boa absorção após administração oral, meia-vida de eliminação de cerca de três horas e rápida biotransformação. São observadas altas concentrações de metabólitos, no entanto, não se sabe se apresentam atividade tripanocida (WETZEL; PHILLIPS, 2015). A posologia consiste em concentração de 8 a 10mg/kg/dia fracionados em três doses administradas durante 60 a 90 dias usualmente

com as refeições. Esse fármaco apresenta efeitos adversos geralmente reversíveis como a anorexia, vômitos, dores abdominais, náuseas, febre, exantemas, perda de memória, transtornos do sono e convulsões sendo contraindicado àqueles pacientes que desenvolveram hipersensibilidade. As apresentações desses efeitos debilitantes para a saúde dos pacientes costumam acarretar na descontinuação da terapia antes do prazo estipulado (DIAS, 2016).

O benznidazol é um análogo nitroimidazol cujo mecanismo de ação, assim como o do nifurtimox, envolve a geração de radicais livres tóxicos para o parasita. Esses radicais gerados reagem com macromoléculas formando ligações covalentes levando a lesões celulares (WETZEL; PHILLIPS, 2015). A posologia do benznidazol consiste na concentração de 5mg/kg/dia fracionadas em duas ou três doses administradas durante 60 dias usualmente com as refeições, sendo a dose diária máxima de 300mg. Esse fármaco apresenta efeitos adversos geralmente reversíveis como exantema, neuropatia periférica, sintomas gastrintestinais e mielossupressão. No geral, o medicamento é bem tolerado sendo a primeira opção de tratamento farmacológico para a doença de Chagas. Contudo, existem casos de intolerância e falhas terapêuticas relatados com o uso desse medicamento sendo necessário o monitoramento de efetividade, efeitos adversos e toxicidade durante o tratamento.

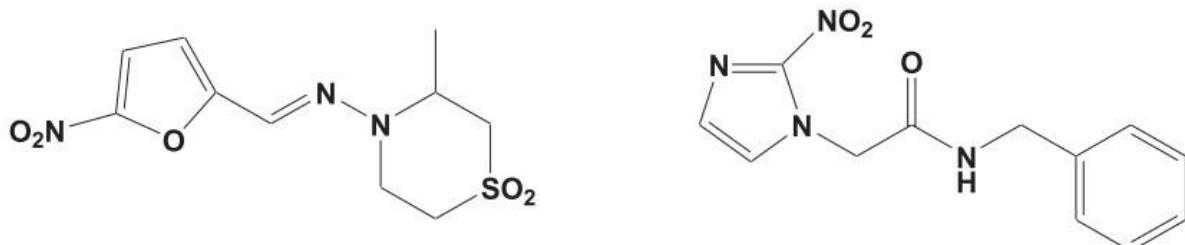
A administração desse medicamento em pacientes com outros agravos, como insuficiência hepática e renal, deve ser avaliada com relação à gravidade e eventos adversos. Cabe ressaltar que o tratamento com esse fármaco não é aconselhável em gestantes e em mulheres em idade fértil que não estejam fazendo o uso de método contraceptivo reconhecidamente efetivo. Para o uso em gestantes deve ser avaliada a relação de risco-benefício (DIAS, 2016).

1.1.3 Química Farmacêutica

Os fármacos benznidazol e nifurtimox são nitroderivados que contêm em suas estruturas as subunidades nitroaromáticas sendo viável a ocorrência de reações redutivas (Figuras 3 e 4). Os grupos nitro ($-\text{NO}_2$) desses fármacos são reduzidos, por

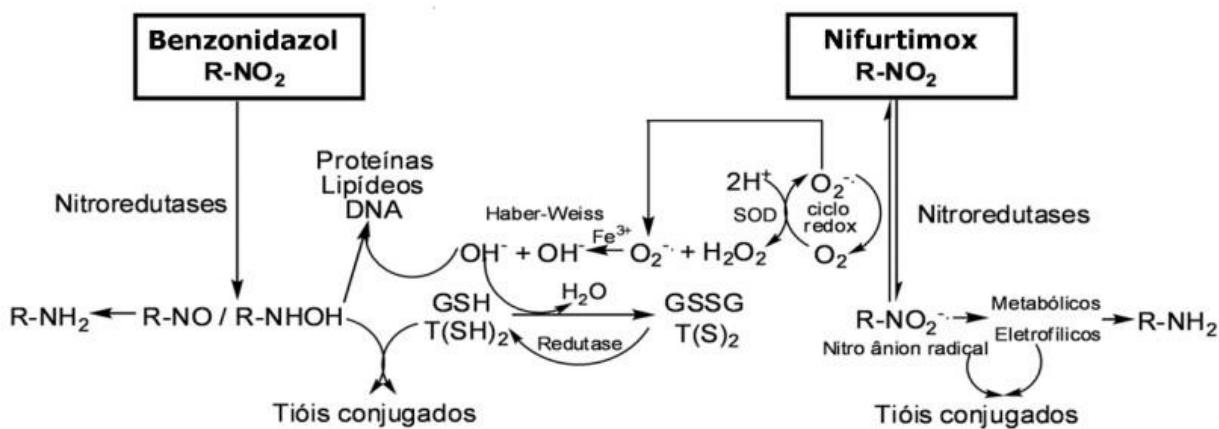
meio da ação das enzimas nitroreduases, a grupos aminos ($-\text{NH}_2$). Durante essa reação é formado um intermediário nitro ânion radical (R-NO_2^-) que leva à formação de hidroxilamina (R-NHOH). No caso do benzonidazol, a hidroxilamina produzida está envolvida em um processo de formação de ligações covalentes com macromoléculas do metabolismo do *T. cruzi* como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e lipídeos (LIMA, 2015; DIAS et al., 2009). O nitrosoimidazol (R-NO) pode então sofrer uma adição eletrofílica à tripanotiona, que leva à depleção da tripanotiona, um sistema enzimático essencial para o parasita (LEMKE, 2013).

Figura 3 - Na esquerda, a fórmula estrutural do fármaco nifurtimox e na direita, a fórmula estrutural do fármaco benznidazol.



Fonte: Lima (2015, p. 69).

Figura 4 - Mecanismo de ação dos fármacos benznidazol e nifurtimox.



Fonte: Dias et al. (2009, p. 2446).

No caso do nifurtimox, o nitro ânion radical reduz o oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido (O_2^-) e regenerando grupos nitro (R-NO_2). Esse íon superóxido (O_2^-) é captado pela enzima superóxido dismutase (SOD) formando

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que na presença de íons férricos (Fe^{3+}) forma o radical hidroxil ($-OH^-$). Esse radical reage com proteínas, lipídeos e DNA do *T. cruzi*. Os metabólitos eletrofílicos gerados são altamente reativos podendo reagir com outros sistemas (LIMA, 2015; DIAS et al., 2009). Em adicional, o fármaco nifurtimox inibe a tripanotiona redutase resultando na inibição de formação de tripanotiona. A tripanotiona é uma enzima protetora encontrada exclusivamente em parasitas tripanossômicos. (LEMKE, 2013)

1.1.5 Aspectos Moleculares: domínio Tc85-LamG

Uma das formas de planejamento de fármacos envolve a busca por alvos moleculares específicos, responsáveis por uma determinada atividade farmacológica, com base nos aspectos moleculares da doença. A partir dos alvos identificados, são planejados compostos potencialmente ativos capazes de interagir através de sua estrutura. A busca por alvos moleculares depende dos conhecimentos prévios de vários processos do parasita tais como os mecanismos de invasão no hospedeiro. Desta forma, o conhecimento do genoma de *T. cruzi* contribui para a identificação de alvos terapêuticos (FERREIRA, 2012).

A invasão do *T. cruzi* nas células hospedeiras humanas é um evento complexo que envolve diferentes proteínas. Dentro desse grupo é observada uma grande família de glicoproteínas altamente polimórficas, denominadas de gp85-transialidase, importantes para direcionar o parasita até as células alvo e pelo processo de infecção (MATTOS, 2014). As proteínas de superfície Tc85 pertencem à família gp85-transialidase e apresentam dois domínios conservados: o domínio de sialidase e um domínio de laminina-G (LamG). O domínio LamG das Tc85, por sua vez, possui uma região conservada essencial para a adesão e invasão celular do parasita. Esta região conservada é constituída pelo motivo peptídico FLY, composto por catorze aminoácidos inseridos na estrutura 3D associados a uma folha pregueada, antiparalelo com o motivo peptídico TS9, composto por nove aminoácidos (Figuras 5, 6 e 7) (TEIXEIRA et al., 2015; DE PABLOS; OSUNA, 2012).

Figura 5 - Esquema dos domínios conservados presentes na família gp85-transialidase.



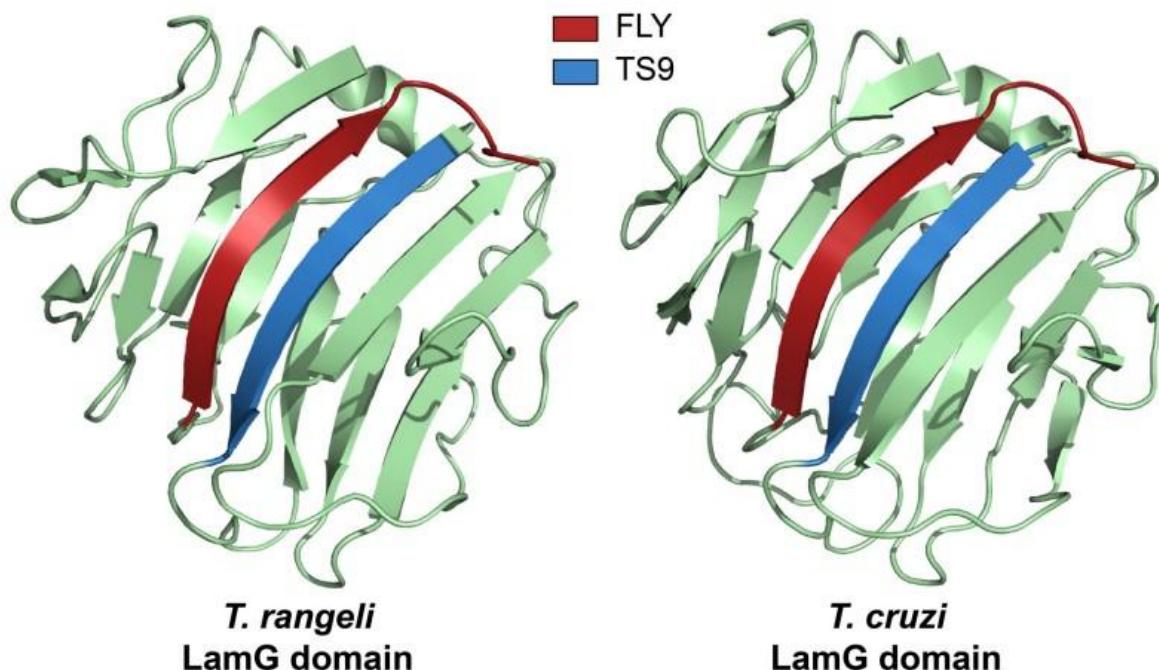
Fonte: Teixeira et al. (2015, p. 10).

Figura 6 - Alinhamento de sequência do domínio Tc85-LamG de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Os aminoácidos idênticos são destacados em azul e as alterações conservadoras em verde.

		LamG domain
<i>T. rangeli</i>	PVVPATPPSKGACGAAVPTAGLVGFLS-HSANGSVWEDVYRCVDANVANAERVPNGLKFN	
<i>T. cruzi</i>	-----IPTAGLVAVLSNASASGDTWNDEYLCLNATVKNATVKVKGDFQLQ	
		TS9
<i>T. rangeli</i>	GVGGGAIVWPVARQGQTRRYQFANYRFTLVATVTIDELPKGTSPLLGAGLEGPGDAKLLGL	
<i>T. cruzi</i>	EPDSRAIWPVNTQGDNVRHISLSHNFTLVASVTIEEAPSEKT-LLTAVLGNTPEPPYIMRI	
		FLY
<i>T. rangeli</i>	SYDKNRQWRPLYGAAPASPTGSWELHKKYHVVLTMADRGQGSVYVDGQPLAGSGNTVVRGA	
<i>T. cruzi</i>	SYTADNKWETMLKDEKTRRSTWELKKEYQVALMLQGNKRSVYVDGELLGEEEVPLTGET	
		FLY
<i>T. rangeli</i>	TLPDISHFYIGG-----PRSKGAPTDSSRTVTNVVLYNRRLNSSIEIRTLFLSQDMI	
<i>T. cruzi</i>	PLE-PFGFCFGACGEDDDGEEPSPEEIGKKPRVTVTNVFLYNRPLNSTEMTAIKDRKPVP	

Fonte: Teixeira et al. (2015, p. 10).

Figura 7 - Diagramas de fita com as estruturas proteicas do domínio LamG de *T. rangeli* e *T. cruzi*. As posições dos peptídeos TS9 (azul) e FLY (vermelho) estão destacadas na estrutura.



Fonte: Teixeira et al. (2015, p. 10).

As formas tripomastigotas infectantes expressam proteínas da família gp85-transialidase, incluindo as Tc85, e podem interagir com diferentes receptores presentes na célula tais como laminina, citoqueratina, vimentina, fibronectina, mucina e procineticina-2 (GIORDANO et al., 1999; MATTOS, 2014). Em destaque, a expressão extracelular de citoqueratina tem papel importante como receptor celular na interação patógeno hospedeiro. A ligação do motivo peptídico conservado FLY na citoqueratina acarreta na ativação da cascata de sinalização ERK1 (quinase 1 regulada por sinal extracelular) e ERK 2 (quinase 2 regulada por sinal extracelular) resultando na proliferação do parasita no citoplasma. Além disso, o motivo FLY pode direcionar o parasita em tecidos específicos (TONELLI, 2009; TEIXEIRA et al., 2015). Desta forma, as proteínas da grande família das gp85/trans-sialidases são alvos interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos anti-tripanossomídicos. Porém, por fazerem parte de uma família tão extensa, com mais de 300 genes, é importante identificar elementos comuns a todos os membros desta família. Estes elementos comuns são os peptídeos TS9 e FLY, formando o domínio de ligação à citoqueratina.

1.2 A METODOLOGIA DO PHAGE DISPLAY

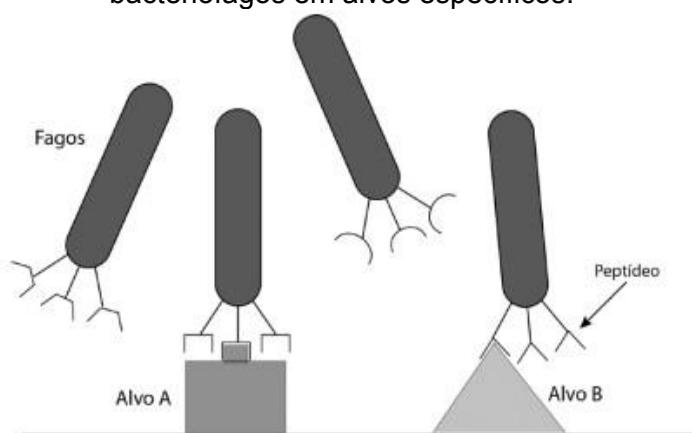
A revolução moderna na biologia molecular inseriu a tecnologia recombinante de phage display como uma poderosa ferramenta para a descoberta de candidatos para o desenvolvimento de fármacos partindo de um alvo biológico específico. Essa tecnologia permite a identificação de produtos biológicos tais como peptídeos, anticorpos e outras proteínas com a capacidade de possibilitar os atributos de fármacos de sucesso como potência, especificidade e estabilidade (NIXON; SEXTON; LADNER, 2014).

Em 1985 foi desenvolvida pelo americano George Pieczenik Smith a metodologia combinatória de phage display (do inglês, exibição de fagos) sendo este agraciado pelo Prêmio Nobel de Química em 2018 pela sua descoberta. O químico demonstrou que a inserção de um gene em bacteriófagos filamentosos resultava na expressão de peptídeos exógenos em fusão com uma proteína da cápsula do fago. Smith foi capaz de selecionar o fago usando um alvo proteico capaz de interagir especificamente ao peptídeo sendo possível, posteriormente, o sequenciamento deste peptídeo. O

processo de seleção foi chamado de panning (do inglês, garimpar) devido à semelhança com o método usado para encontrar ouro. O prêmio foi compartilhado entre com o inglês Gregory Winter o qual empregou esta abordagem na geração de anticorpos com o objetivo de produzir novos agentes terapêuticos. O adalimumabe, utilizado para a terapia de artrite reumatoide, psoríase e doenças inflamatórias intestinais, foi o primeiro anticorpo humano derivado desse método aprovado (THE NOBEL PRIZE, 2020; FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016).

A metodologia de phage display permite a seleção de moléculas ligantes que tenham afinidade, seletividade e interações com o alvo de interesse através da abordagem de exibição de peptídeos na superfície filamentosa de bacteriófagos (Figura 8). Essa técnica possibilita a varredura e isolamento de peptídeos ligantes em algumas etapas sem a necessidade de conhecimento prévio da estrutura molecular do alvo. Estes peptídeos isolados contêm informações sobre o sistema podendo auxiliar no entendimento das interações biomoleculares e caracterização de ligantes podendo ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, essa ferramenta biotecnológica representa uma alternativa atraente devido aos menores custos de produção, a reprodutibilidade geral e ao tempo de processo sendo utilizada em diferentes áreas da ciência. Desde então, esta metodologia se tornou uma importante ferramenta eficaz na produção de grandes quantidades de peptídeos, proteínas e anticorpos (MAGALHÃES et al., 2016).

Figura 8 - Interação de peptídeos específicos presentes na superfície filamentosa de bacteriófagos em alvos específicos.

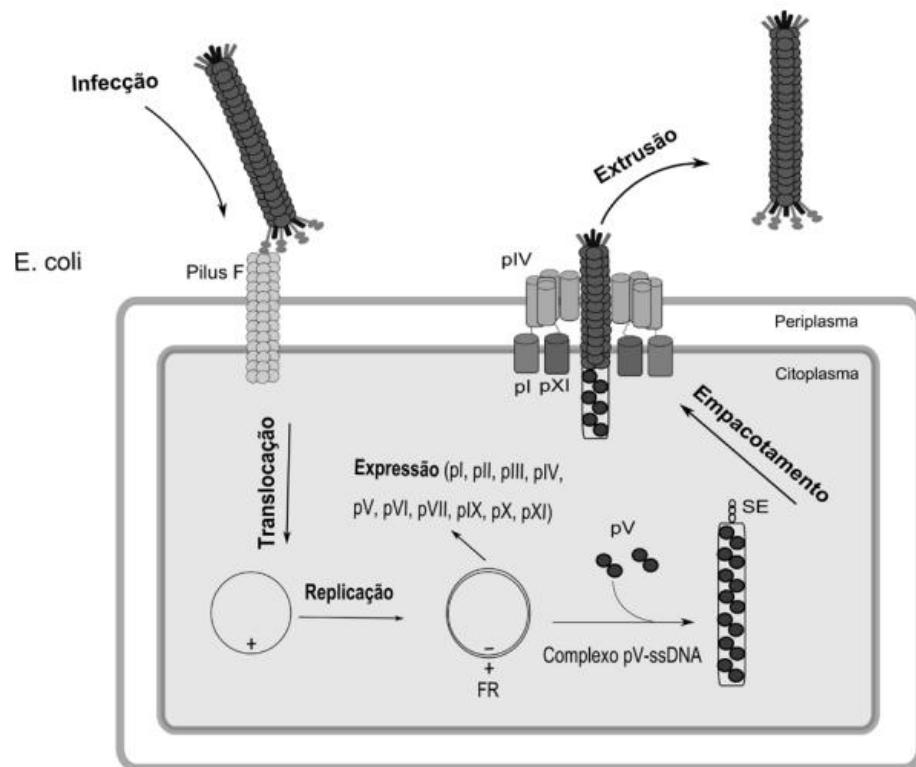


Fonte: Magalhães et al. (2016, p. 150).

1.2.1 Bibliotecas de fagos

As bibliotecas são compostas comumente por bacteriófagos filamentosos f1, Fd e M13 que pertencem a uma família de vírus de DNA simples fita capazes de infectar bactérias gram-negativas sendo muito estudados e utilizados na exibição de fagos, entretanto, outros vetores foram descobertos como o lambda e o T7. Os fagos f1, Fd e M13 infectam bactérias *Escherichia coli* positivas para o plasmídeo F por meio do pilus L bacteriano e apresentam como vantagem a capacidade de inserção de grandes fragmentos de DNA no genoma. A apresentação de peptídeos é restrita às proteínas que compõe o capsídeo viral sendo elas a III, VI, VIII e IX. A proteína pIII é formada por três domínios, denominados de N1, N2 e CT, e desempenha importantes funções na infecção da célula hospedeira pois está envolvida na ligação do pilus L bacteriano e na translocação de DNA para o citoplasma (Figura 9) (MAGALHÃES et al., 2016; WEBSTER, 2001).

Figura 9 - Ciclo de vida dos bacteriófagos filamentosos.



Fonte: Magalhães et al. (2016, p. 153).

De maneira geral, cada biblioteca utilizada no phage display contém bilhões de bacteriófagos. Cada fago possui uma sequência aleatória do gene exógeno possibilitando que cada fago apresente um peptídeo diferente na superfície do seu capsídeo. Existem dois parâmetros importantes na qualidade de uma biblioteca sendo eles a diversidade e o título. A diversidade está relacionada com o número de possibilidades de peptídeos contendo sequências únicas de aminoácidos aleatórios estarem presentes na biblioteca de fagos. O título da biblioteca é outro parâmetro utilizado sendo expresso em unidades transdutoras de colônia por microlitro de solução e corresponde ao número de partículas virais totais após a amplificação.

Por exemplo, para uma biblioteca X6 (X = qualquer aminoácido), a combinação aleatória dos vinte aminoácidos naturais conhecidos em peptídeos contendo sequências com seis aminoácidos é de 20^6 que corresponde a $6,4 \times 10^7$ possibilidades. Contudo, na prática, o intuito é produzir bibliotecas que contenham um número de transformantes na ordem de 10^9 e 10^{10} sendo superior à diversidade. Caso a biblioteca tenha uma diversidade de 2×10^9 transformantes e um título de 1×10^9 UT/uL, poderão ser obtidos 31 vezes mais clones do que o número de peptídeos possíveis (MAGALHÃES et al., 2016).

1.2.2 Aplicações biotecnológicas

A tecnologia de phage display é uma ferramenta com interesse biotecnológico que possibilita o mapeamento de epítopos para o uso o desenvolvimento de vacinas, o mapeamento de sítios de ligação em proteínas, como enzimas e receptores, auxiliando no estudo de interações moleculares proteína-proteína, úteis para o desenvolvimento racional de fármacos. Os peptídeos identificados no phage display são oportunos ainda para o direcionamento de agentes terapêuticos para uma determinada região tumoral através de peptídeos tumores-específicos, para a caracterização de receptores e ligantes em sistemas biológicos, para a criação de fatores de transcrição sintéticos e de peptídeos tecido-específicos acoplados a marcadores para serem usados no diagnóstico (BAZAN; CALKOSINSKIM; GAMIAN, 2012; MAGALHÃES et al., 2016).

Neste presente projeto vamos identificar possíveis peptídeos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas.

Uma aplicação tecnológica promissora é a criação de anticorpos monoclonais a partir dessa metodologia. Nas últimas décadas os anticorpos monoclonais se tornaram a classe de produtos biológicos mais importante do mercado. O adalimumabe, comercializado como Humira®, é um exemplo de anticorpo monoclonal que demonstra a contribuição do phage display como uma técnica na descoberta de produtos farmacêuticos. De modo geral, esse anticorpo possui bioespecificidade que contribui para a sua ligação ao fator de necrose tumoral (TNF) impedindo que o TNF se ligue aos seus receptores. Ele foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil, artrite psoriática, espondilite anquilosante, doença de Crohn, colite ulcerativa e psoríase em placas (NIXON; SEXTON; LADNER, 2014; FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016).

2. OBJETIVOS

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que atinge milhões de pessoas no mundo e carece de alternativas para o tratamento farmacológico. Atualmente existem apenas dois fármacos disponíveis, sendo eles o benznidazol e o nifurtimox, que apresentam toxicidade, efeitos colaterais debilitantes e baixa eficácia na fase crônica. Além disso, existem cepas do agente etiológico *Trypanosoma cruzi* que apresentam resistência a esses fármacos. Para tanto, torna-se necessário o estudo molecular de alvos importantes presentes no *T. cruzi* visando à pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

A seleção e identificação de ligantes de alta afinidade contribuem para o entendimento das interações biomoleculares possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos. Neste presente trabalho, foram estudados possíveis ligantes do domínio Tc85-LamG utilizando a metodologia biotecnológica de phage display. Esse domínio possui uma região conservada que envolve o peptídeo TS9 antiparalelo ao peptídeo FLY e exerce um papel essencial na invasão celular do parasita. Em paralelo foram estudados possíveis ligantes do Peptídeo J (PepJ) que possui em sua constituição o motivo peptídico conservado FLY.

Em adicional, as perspectivas deste trabalho incluem o levantamento bibliográfico com intuito de verificar como a metodologia de phage display está sendo utilizado na pesquisa científica atualmente envolvendo a doença de Chagas. Para tanto, foi utilizada a base de dados Pubmed e SciELO para coletar as informações dos periódicos cujos conteúdos envolveram aplicações biotecnológicas desta metodologia à luz do conhecimento atual. Diante disso, o período contemplado de coleta de informações relevantes será de publicações do ano de 2010 até o presente momento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PARTE PRÁTICA

A parte prática foi realizada durante o projeto de Iniciação Científica, sob o título “Identificação por *phage display* de peptídeos ligantes de proteínas importantes para adesão e invasão celular pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*”, desenvolvido em 2018, no Laboratório de Bioquímica Combinatória do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Este projeto, que contou com o financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, envolveu a produção do domínio LamG pertencente à proteína Tc85; a seleção e identificação de peptídeos ligantes do domínio Tc85-LamG e do PepJ por *phage display* e, por fim, ensaios de ligação para a validação desses peptídeos.

3.1.1 Síntese do domínio Tc85-LamG

A produção do domínio Tc85-LamG incluiu as etapas de clonagem molecular, de expressão da proteína recombinante, de extração e de purificação utilizando a resina de níquel. Após a sua produção, esse domínio foi armazenado no congelador a -20°C, para ser utilizado posteriormente na etapa de panning. Na etapa de clonagem molecular, o gene que codifica o domínio LamG da proteína Tc85 foi amplificado por meio da técnica de reação em cadeira de polimerase (PCR) utilizando os iniciadores específicos (Quadro 1) e clonado no vetor pET21a usando as enzimas de restrição NdeI e SalI.

Quadro 1 - Iniciadores específicos utilizados na clonagem do domínio LamG.

Nome do iniciador	Sequência de aminoácidos
<i>Forward</i>	GACCATATGCTGGTGGCGGTATTGTCAAAC
<i>Reverse</i>	GACGTCGACATTCAAGTGGCGGTTGTACAG

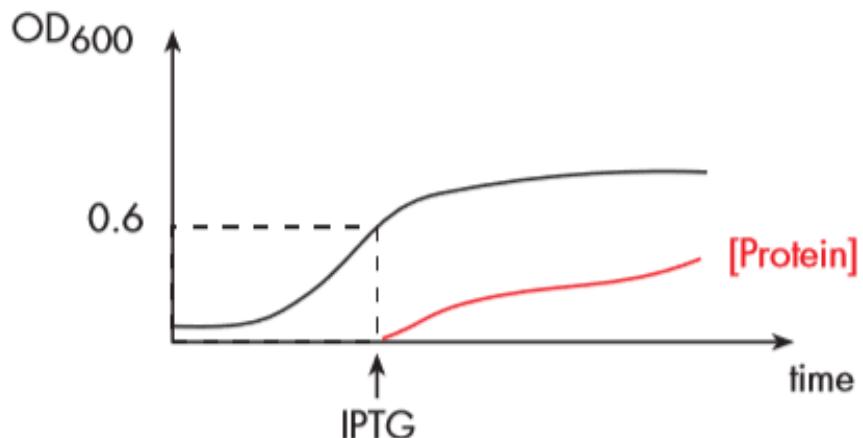
Fonte: Teixeira et al. (2015, p. 19).

As moléculas de DNA recombinante são introduzidas nas células hospedeiras através do processo de transformação. Esse DNA recombinante contém, além do gene de interesse, dois outros genes importantes que conferem a resistência aos antibióticos e que codificam o marcador peptídico 6X-Histidina (6X-His) possibilitando, respectivamente, as etapas de seleção de células recombinantes e de purificação.

Neste processo, o pulso elétrico de alta voltagem é acionado no eletroporador para a abertura temporária de pequenos poros na superfície da membrana celular da célula hospedeira possibilitando a entrada do DNA nesta. A seleção das células transformadas das células que não receberam a molécula recombinante ocorre através da resistência aos antibióticos, tetraciclina e canamicina.

As células hospedeiras utilizadas no processo de expressão foram de *E. coli* BL21 Rosetta pLysS cultivadas em meio de cultura lisogênico (LB) estéril e ampicilina a 37°C. O acompanhamento do crescimento da colônia de bactérias *E. coli* foi realizado através de medições da densidade ótica. O indutor isopropil-beta-D-tiogalactopiranósideo (IPTG) 0,8mM foi adicionado para expressão do gene que codifica a proteína de interesse após o crescimento das células hospedeiras em meio LB e ampicilina a 30°C até a densidade ótica ótima em torno de 0,6Abs (Figura 10). As células foram rompidas em tampão desnaturante (fosfato 100 mM; tampão pH 8,0, Tris 10mM, ureia 8M) e armazenadas no gelo.

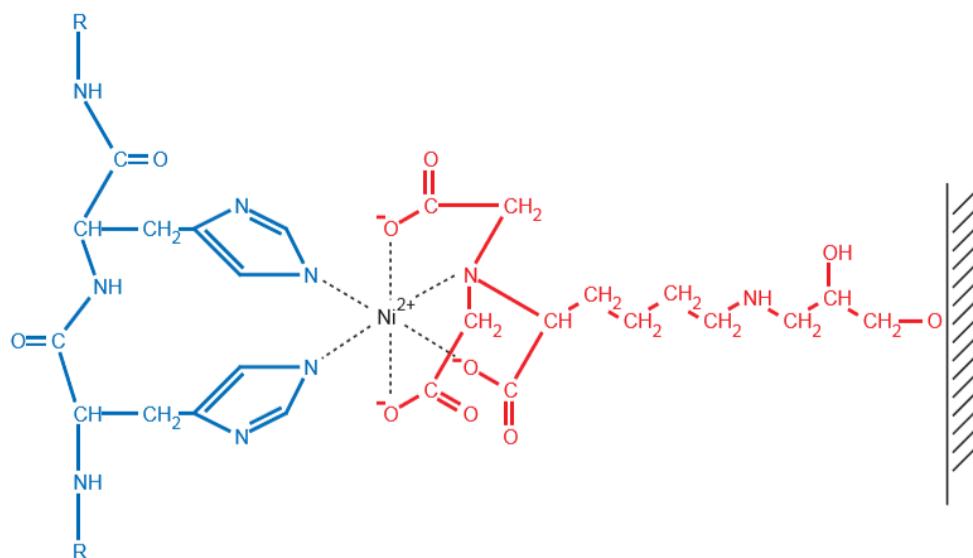
Figura 10 - Indução da expressão de uma proteína por adição de IPTG à cultura celular.



Fonte: QIAGEN (2003, p. 48).

A purificação da proteína recombinante foi feita por meio da cromatografia de afinidade de metal imobilizado utilizando a resina de níquel nitrilotriacético (Ni^{2+} -NTA), comercializada pela QIAGEN®, que interage com o marcador peptídico 6X-His fusionado na proteína de interesse (Figura 11). Esse marcador peptídico contém em sua estrutura uma sequência de seis histidinas. A resina foi lavada com tampão de lavagem desnaturante (tampão fosfato 100mM, pH 6,3, Tris 10mM, ureia 8M) e proteína ligada eluída com tampão de eluição desnaturante (tampão fosfato 100mM, pH 3,5, Tris 10mM, ureia 8M). Uma solução de Tris 1M em pH 8,0 foi usada para ajustar o pH do eluato e foi adicionado 0,5% de β -mercaptoetanol.

Figura 11 - Resina de Ni^{2+} -NTA interagindo com o marcador peptídico 6X-His.



Fonte: QIAGEN (2003, p. 19).

A proteína recombinante foi reenovelada por diálise em solução salina tamponada com fosfato (PBS), diluído em água miliQ, contendo concentrações decrescentes de ureia (4M, 2M, 1M e 0,5M de ureia durante um período de 2h cada). A diálise final foi realizada em PBS diluído em água miliQ durante a noite em condições de baixa temperatura. O acompanhamento da produção da proteína foi feito a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódio (SDS-PAGE) das frações recolhidas na etapa de purificação. As frações contendo proteína foram armazenadas no congelador a -20°C em alíquotas contendo 5% de glicerol. A

quantificação de proteína foi realizada usando o Pierce™ BCA *Protein Assays Kit* comercializado pela Thermo Scientific™.

3.1.2 Phage display e panning

Na etapa de phage display foram utilizadas duas bibliotecas, elaboradas pelo próprio laboratório, contendo fagos fusionados a peptídeos com sequências aleatórias. A biblioteca X6 contém fagos fusionados a peptídeos contendo sequências de seis aminoácidos aleatórios e a biblioteca CX8C contêm fagos fusionados a peptídeos contendo sequências de oito aminoácidos aleatórios e cisteínas nas extremidades. Essas cisteínas são unidas entre si por uma ligação dissulfeto formando um peptídeo circular.

Os alvos de interesse utilizados foram a proteína Tc85-LamG e o PepJ. O domínio Tc85-LamG recombinante foi purificado, como detalhado anteriormente, e o PepJ, de sequência GKKPSVTVTNVFLYNRPLN-NH₂, foi obtido comercialmente e solubilizado na concentração de 10ug/mL em PBS. Com isso, foram conduzidos quatro experimentos separados para cada biblioteca de fagos utilizada e para cada alvo de interesse (Quadro 2).

Quadro 2 - Relação do alvo de interesse imobilizado na placa e a biblioteca de fagos utilizada.

Alvos de interesse imobilizados na placa

	Tc85-LamG	PepJ
Bibliotecas de fagos	X6 Tc85-LamG e X6	PepJ e X6
	CX8C Tc85-LamG e CX8C	PepJ e CX8C

Fonte: produção do próprio autor.

Cerca de 200ng de cada alvo de interesse diluído em 50µl de PBS estéril é imobilizado em placa de poliestireno estéril de alta adesão de proteínas contendo 96 poços de fundo chato. Os alvos devem ser colocados em poços fisicamente separados

e demarcados, a fim de evitar a contaminação cruzada, e incubados durante a noite na geladeira a 4°C. Após a incubação, os alvos são retirados dos poços e guardados a -20°C. Os poços são completados totalmente com a solução de bloqueio BSA 1% em PBS estéril e incubados a temperatura ambiente durante 2h. Após esse período, a solução é retirada dos poços e os mesmos são lavados com PBS estéril.

Cada biblioteca a 10^9 TU é adicionada sobre o alvo imobilizado em placa de alta ligação. São feitas lavagens com PBS estéril para a retirada dos fagos que se ligaram com pouca afinidade ao alvo. Ao final, os fagos que se ligaram com maior afinidade à proteína de interesse são recuperados por infecção na bactéria *E. coli* K91, resistente à canamicina, em meio LB a 37°C e 250RPM por 18 a 20h. O meio LB foi previamente preparado com os antibióticos canamicina e tetraciclina, a fim de recuperar apenas as bactérias infectadas pelos fagos, e esterilizado por autoclavagem.

Para o primeiro ciclo, é coletado o sobrenadante do meio de cultura contendo os fagos recuperados por precipitação pelo método do polietilenoglicol em cloreto de sódio (PEG-NaCl). A solução é centrifugada e o precipitado contendo os fagos é coletado e ressuspensionado em PBS estéril para o seu armazenamento no refrigerador. Para o segundo e terceiro ciclos, os fagos recuperados contidos no meio do segundo ciclo são precipitados e usados para o terceiro ciclo. Os fagos recuperados contidos no meio do terceiro ciclo são precipitados e usados para análises posteriores de identificação de peptídeos.

Além da etapa de precipitação em PEG-NaCl, o meio contendo bactérias e fagos é diluído e plaqueado em placa de ágar estéril contendo os antibióticos canamicina e tetraciclina para a seleção das bactérias infectadas das bactérias não infectadas. As placas de ágar são mantidas na estufa a 37°C para o crescimento para que, posteriormente, sejam realizados a contagem das colônias e o cálculo de enriquecimento entre os ciclos. Em paralelo, são plaqueados os fagos Fd para controle do crescimento das colônias de *E. coli* K91 naquele dia. As colônias foram coletadas em meios apropriados e conservadas no congelador para posteriores análises.

3.1.3 Identificação de peptídeos

Cada colônia isolada foi infectada por um fago que possui uma sequência de aminoácidos para a produção do peptídeo. Desta forma, para cada colônia foi identificado à sequência de um peptídeo por meio de sequenciamento de DNA. A técnica de PCR foi utilizada para a amplificação do gene de interesse, isto é, gene contendo a sequência de aminoácidos do peptídeo, para posterior sequenciamento no Serviço de Sequenciamento de DNA da Central Analítica do Instituto de Química. A leitura dos cromatogramas foi realizada por meio da ferramenta *Benchling* e a busca por similaridade entre sequências obtidas foi feita com o uso da ferramenta *Clustal Omega*. As sequências peptídicas que apareceram mais de uma vez no sequenciamento foram selecionadas para a etapa de validação.

Em cada amostra, contendo cada colônia isolada diluída em PBS estéril, são adicionados os reagentes da PCR que são constituídos pelo tampão de Taq, cloreto de magnésio, água purificada estéril, a enzima Taq polimerase, dNTP, o par de iniciadores *forward* e *reverse*. Essa etapa é realizada na capela de fluxo laminar vertical e horizontal. As amostras são colocadas no termociclador com tempo e temperatura programados para 34 ciclos. Após o término da ciclagem, as amostras são colocadas no gel de agarose para a corrida. A quantificação absoluta do produto de PCR é realizada através do programa computacional *ImageLab™*. Os produtos de PCR com concentração de 3 a 10ng/uL são selecionadas para a reação de sequenciamento.

Na etapa do sequenciamento, os produtos de PCR selecionadas na etapa prévia são diluídos e são adicionados os reagentes da reação sendo eles constituídos pelo tampão de *BigDye®*, iniciador R1, *BigDye®* e água para PCR. Essa etapa é realizada na capela de fluxo laminar vertical e horizontal. As amostras são colocadas no termociclador com tempo e temperatura programados para 40 ciclos. Após a ciclagem é realizada a etapa de precipitação dos produtos de sequenciamento. Para isso, são acrescentados nas amostras o acetato de sódio 3M em pH 3,2, o glicogênio 20mg/mL, etanol 100% e iniciada a etapa de centrifugação a força centrífuga relativa (RCF) de 15.000xg sob refrigeração a 4°C. Ao final da centrifugação, as amostras são colocadas

no termociclador para a secagem a 65°C e levadas para o Serviço de Sequenciamento de DNA.

3.1.4 Ensaio de ligação

Esta etapa é importante para a validação da ligação do fago contendo o peptídeo selecionado no alvo de interesse. Para isso, os fagos contendo os peptídeos selecionados foram amplificados, identificados e guardados na geladeira para posteriores ensaios. A albumina do soro bovino (BSA) e os fagos Fd foram utilizados como controles no ensaio de ligação. Assim sendo, foi usado BSA 3% em PBS para verificação da afinidade do fago contendo o peptídeo selecionado com outra proteína que não a de interesse e foram usados os fagos Fd na proteína de interesse para a verificação da adesividade de fagos.

Ao final, os fagos que se ligaram com maior afinidade aos alvos de interesse são recuperados em meio LB estéril contendo os antibióticos tetraciclina e canamicina por infecção na bactéria *E. coli* K91 resistente à canamicina. As soluções, contendo bactérias e fagos, foram colocadas em meios apropriados, diluídas 10X e 100X, e plaqueadas em triplicata em ágar estéril contendo antibióticos para seleção das bactérias infectadas das bactérias não infectadas e mantidas na estufa para crescimento de colônias. Posteriormente foram feitas as contagens de colônias nas placas e as multiplicações pelos fatores de diluição para obtenção do número de unidades transdutoras por microlitro. A partir desses dados foram feitos os gráficos dos ensaios de ligação com intuito de comparar a afinidade dos peptídeos nos diferentes alvos proteicos.

3.2 PARTE TEÓRICA

Para a coleta de informações dos periódicos cujos conteúdos envolveram aplicações terapêuticas da metodologia de phage display no que tange a doença de Chagas foram utilizadas as bases de dados PubMed e SciELO. A base de dados Pubmed compila artigos relevantes no campo da biotecnologia de maneira ampla e

mundial e por isso foi utilizado como fonte do levantamento bibliográfico. A SciELO abrange uma coleção selecionada de periódicos científicos brasileiros. O período de coleta de informações relevantes contemplou publicações do ano de 2010 até o presente momento.

O intuito desse levantamento é analisar, nos últimos dez anos, as publicações de artigos científicos que relacionem a metodologia de phage display e a doença de Chagas, tal como apresentamos nesse presente trabalho, no que tange as aplicações biotecnológicas potenciais. As palavras-chave utilizadas nessa busca foram “phage display” e “Trypanosoma”, “phage display” e “cruzi”, “phage display” e “chagas”.

Os critérios de exclusão envolveram o ano de publicação do periódico e o assunto abordado uma vez que os assuntos de phage display e doença de Chagas precisam estar atrelados. Os critérios de inclusão foram publicações recentes, artigos científicos que relacionem de maneira direta a técnica de phage display com a doença de Chagas. Os artigos científicos publicados serão contabilizados e avaliados com base nos conteúdo dos resultados.

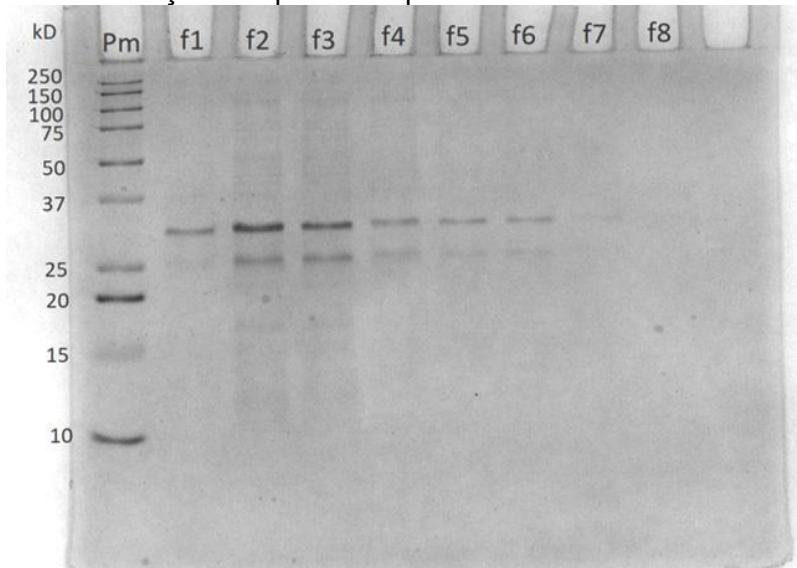
4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PRÁTICOS

4.1.1 Síntese da proteína Tc85-LamG

A proteína Tc85-LamG purificada foi analisada em gel de SDS-PAGE. Foi observado a presença de duas proteínas com pesos moleculares aparentes de 25 a 34kDa (Figura 12). O peso esperado para a proteína em questão é de aproximadamente 34kDa, portanto, a proteína de 25kDa é, possivelmente, um fragmento proteolítico da Tc85-LamG. As frações f2 e f3 foram as mais enriquecidas em proteína e foram selecionadas para este estudo. A concentração de proteína Tc85-LamG obtida foi em torno de 78,79ng/uL.

Figura 12 - Análise por SDS-PAGE das frações eluídas da coluna de Ni^{2+} -NTA durante a purificação da proteína Tc85-LamG. O gel foi corado com azul de Coomassie para visualização das proteínas presentes nas amostras.



Fonte: produção do próprio autor.

4.1.2 Phage display e panning

No total, foram realizados três ciclos de seleção para a identificação de fagos ligantes da proteína LamG e do PepJ. A proteína ou peptídeo foram imobilizados em

placas de 96 poços e incubados individualmente com cada uma das bibliotecas de phage display, X6 e CX8C, individualmente. Após lavagem, os fagos ligantes foram recuperados, amplificados e utilizados para o ciclo seguinte de seleção. Após os três ciclos de seleção de phage display, observamos um enriquecimento significativo no número de fagos ligantes nos alvos Tc85-LamG e PepJ. Isto sugere que houve seleção de peptídeos ligantes para os dois alvos.

4.1.3 Análise de dados

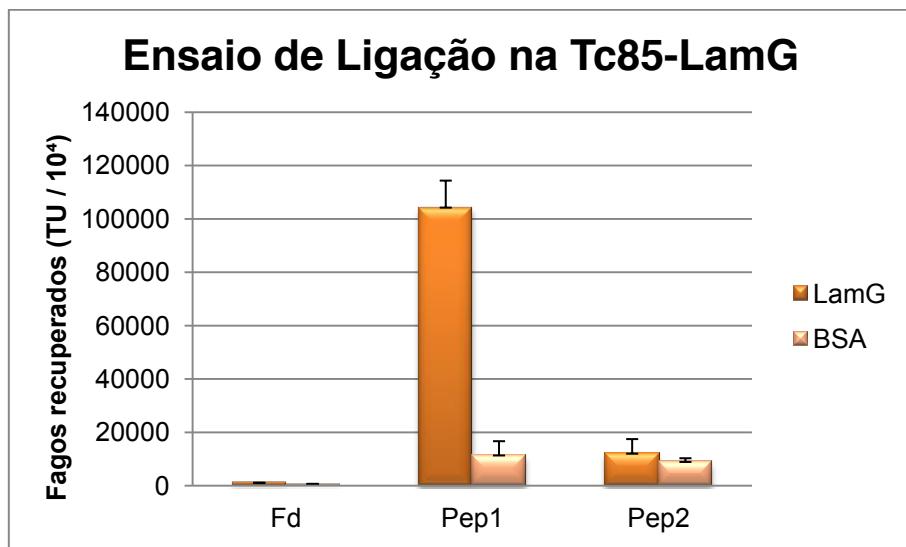
Os clones individuais de fagos foram selecionados para análise por sequenciamento de DNA através do método de Sanger. Nesta análise, sequencia-se a região do inserto exógeno codificante para o peptídeo apresentado. Os resultados recebidos pelo Serviço de Sequenciamento de DNA foram analisados com a ferramenta *Benchling* e a busca por similaridade entre sequências obtidas foi feita com o uso da ferramenta *Clustal Omega*.

Para o alvo Tc85-LamG não foram encontradas sequências repetidas enriquecidos durante a seleção. Assim sendo, todas as sequências encontradas foram alinhadas para verificar a similaridade entre elas e buscar por motivos peptídicos conservados. Duas sequências, derivadas dos peptídeos oriundos da biblioteca X6, e denominados de Pep1 e Pep2, foram selecionadas por similaridade de sequência entre si. Já, para o alvo PepJ, de 22 amostras de sequenciamento dos peptídeos derivados da biblioteca CX8C, 12 codificavam para uma mesma sequência peptídica denominada como Pep5. Por similaridade, desta mesma biblioteca, o peptídeo Pep6 também foi selecionado para avaliação. Não foram identificados peptídeos ligantes para PepJ derivados da biblioteca X6.

Para a validação da interação dos peptídeos Pep1 e Pep2 com a proteína LamG, e dos peptídeos Pep5 e Pep6, com o peptídeo J, realizamos ensaios de ligação de fago. Os fagos individuais foram amplificados, titulados e sequenciados, para confirmar a presença do peptídeo na sua superfície. A seguir, cada um dos fagos, apresentando os peptídeos selecionados, foi incubado individualmente com BSA, Tc85-LamG ou

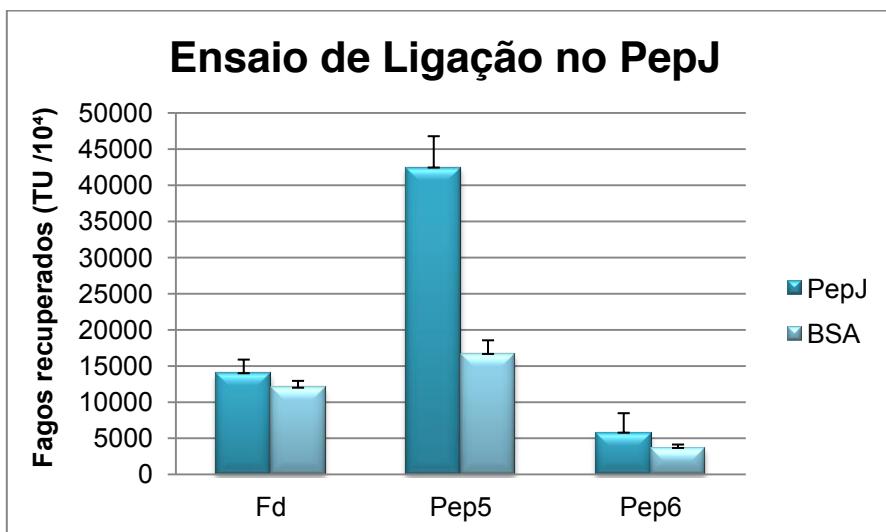
PepJ. Como controle negativo, utilizou-se o fago Fd, que não contém inserto exógeno e, portanto, não apresenta nenhum peptídeo na sua superfície. Após lavagem, os fagos ligados aos alvos imobilizados foram quantificados por contagem de colônia (Gráficos 1 e 2). Observamos que apenas os peptídeos Pep1 e Pep5 se ligaram especificamente aos seus respectivos alvos. Não houve ligação significativa dos demais fagos aos seus ligantes.

Gráfico 1 - Resultados obtidos após o ensaio de ligação na Tc85-LamG.



Fonte: produção do próprio autor.

Gráfico 2 - Resultados obtidos após o ensaio de ligação no PepJ.



Fonte: produção do próprio autor.

Os fagos contendo os peptídeos 1 e 5 tiveram alta afinidade respectivamente com os alvos Tc85-LamG e PepJ (Gráficos 1 e 2).

4.2 RESULTADOS TEÓRICOS

4.2.1 Levantamento bibliográfico

No total foram encontrados vinte artigos científicos utilizando as palavras-chave “phage display” e “*Trypanosoma*” na base de dados PubMed. Do total, treze artigos foram publicados recentemente no período de 2010 a 2020. Destes treze artigos, apenas quatro conseguiram contemplar a utilização da metodologia de phage display relacionado com o agente etiológico da doença de Chagas. Além disso, esses quatro artigos contaram principalmente com a participação de pesquisadores brasileiros e com o financiamento de órgãos de pesquisa públicos. As demais palavras-chave conduziram para artigos semelhantes ou para artigos que não possuem os critérios para a inclusão nesta pesquisa. Ainda, a consulta na base de dados SciELO não resultou em artigos científicos relevantes utilizando as palavras-chave estabelecidas.

Com a pesquisa foi possível observar que Tonelli et al. (2010) utilizaram a metodologia de phage display no estudo do motivo peptídico FLY mostrando a contribuição desse peptídeo para o tropismo tecidual pelo *T. cruzi*. Khusal et al. (2015) identificaram a sequência peptídica GGIALAG, presente no receptor de procineticina-3 (PKR2), através do phage display. Essa sequência identificada estaria envolvida na invasão de *T. cruzi* em células de mamíferos e disseminação do parasita uma vez que é descrita como um novo receptor para as proteínas de superfície Tc85 pertencentes à família gp85. Teixeira et al. (2015) identificaram motivos peptídicos compartilhados pelas proteínas da família gp85 de *T. cruzi* usando a metodologia de phage display. Esses motivos peptídicos selecionados foram rastreados quanto à sua capacidade de se ligar às células sugerindo um papel importante do domínio conservado LamG, Sáenz-Garcia et al. (2020) relataram a utilização da metodologia de phage display para a identificação de um peptídeo, denominado de EPI18, capaz de se ligar à superfície de

epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* com especificidade confirmada.

4.2.2 Análise de dados

O levantamento bibliográfico resultou em uma baixa quantidade de artigos científicos que relacionem a metodologia de phage display com a doença de Chagas. De modo geral, as publicações existentes são financiadas por órgãos de pesquisas públicos e as pesquisas estão restritas ao Brasil. Diante das buscas realizadas nas bases de dados foi constatado que a metodologia de phage display, no que tange a doença de Chagas, esta sendo empregada para identificação de peptídeos de interesse ligantes de alvos presentes no parasita. Porém, dado o baixo número de publicações, existe muito espaço para a pesquisa nesta área utilizando-se a metodologia do phage display.

Cabe ressaltar que os artigos publicados por Tonelli et al. (2010) e Teixeira et al. (2015) foram essenciais para o desenvolvimento deste presente trabalho. Esse fato mostra a importância da existência de artigos de base para a elaboração de novos projetos científicos. Além disso, o financiamento público das pesquisas envolvendo esta doença negligenciada é pertinente para a geração de conteúdo.

5 DISCUSSÃO

As vantagens do uso da ferramenta biotecnológica de phage display incluem os métodos rápidos, eficientes, com baixo custo, robustez, versatilidade, menor imunogenicidade de peptídeo, quando comparado com grandes proteínas, e especificidade. Cabe esclarecer que a metodologia permite a identificação de peptídeos de interesse como uma etapa prévia ao desenvolvimento de candidatos de novos fármacos e produtos farmacêuticos. A identificação de peptídeos colabora para o entendimento de interações entre o ligante e o alvo biológico de estudo e muitas vezes os peptídeos isolados muitas vezes se assemelham aos ligantes naturais das moléculas em estudo. Contudo, outras análises e estudos precisam ser realizados visando o desenvolvimento racional de fármacos, de vacinas, à criação de fatores de transcrição sintéticos, entre outras aplicações (MAGALHÃES et al., 2016; FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016; NIXON; SEXTON; LADNER, 2014).

As limitações da técnica envolvem a capacidade de adesão do fago ao alvo e a capacidade de propagação alterada de alguns fagos frente aos outros. Nesse último caso pode ocorrer o favorecimento de alguns clones que se replicam de forma mais eficiente em detrimento dos outros acarretando em um viés de seleção de fagos que apesar de possuírem baixa afinidade com o alvo possuem um crescimento rápido. A toxicidade ocasionada por peptídeos para as bactérias é outra limitação durante o processo da amplificação que pode acarretar na não seleção de peptídeos relevantes (MAGALHÃES et al., 2016).

A viabilidade desta técnica na identificação de sequências peptídicas de interesse foi apresentada em publicações científicas recentes visando os estudos de interações de potenciais alvos farmacológicos presentes no *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA et al., 2015; KHUSAL et al., 2015, SÁENZ-GARCIA et al, 2020). Neste trabalho, a nova abordagem utilizando a metodologia de phage display mostrou-se viável, pois permitiu a identificação de dois fagos com sequências peptídicas específicas e de alta afinidade para ligação no domínio Tc85-LamG e no PepJ. Apesar de o PepJ possuir na sua constituição o motivo peptídico conservado FLY que é

pertencente ao domínio Tc85-LamG, os peptídeos encontrados nos ensaios com o PepJ não demonstraram similaridade com os peptídeos identificados com a Tc85-LamG. Estes possivelmente interagem com alguma outra região do domínio Tc85-LamG.

6 CONCLUSÃO

A doença de Chagas constitui um obstáculo para os sistemas de saúde públicos e para o desenvolvimento social e econômico do país. Em virtude do limitado repertório de fármacos disponíveis, a necessidade de novas alternativas terapêuticas é evidente. O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos engloba inúmeras estratégias e necessita de investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D). Entretanto, é observado um baixo investimento de recursos em P&D em doenças negligenciadas por parte das principais indústrias farmacêuticas e biotecnológicas do mundo, em razão do baixo retorno financeiro. Desta forma, a academia juntamente com os órgãos nacionais financiadores de pesquisa, possuem um papel considerável na contribuição da fase inicial de P&D para essas doenças.

Neste trabalho foi apresentada a abordagem biotecnológica de phage display, que se mostrou bastante promissora nos últimos anos, com a identificação de possíveis peptídeos ligantes do domínio Tc85-LamG. Esse domínio possui uma região conservada essencial para a adesão e invasão celular do *Trypanosoma cruzi* sendo um alvo interessante do ponto de vista farmacológico. Assim, os peptídeos selecionados poderão ser candidatos para ensaios de inibição da infecção celular pelo parasita. A seleção e identificação de ligantes de alta afinidade contribuem, ainda, para o entendimento das interações biomoleculares possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos de interesse para a terapêutica da doença de Chagas. Apesar desta ferramenta de phage display possibilitar contribuições na perspectiva farmacológica, foi observado poucos trabalhos científicos publicados relacionando a metodologia de phage display com essa enfermidade. Sendo assim, o presente trabalho contribuiu para a ampliação das metodologias empregadas na busca de compostos de interesse para a terapêutica bem como na geração de conhecimentos para esta doença tão importante no Brasil.

REFERÊNCIAS²

- BAZAN, J.; CALKOSIŃSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display: a powerful technique for immunotherapy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1817-1828, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4161/hv.21703>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3656071/>. Acesso em: 24 out. 2020.
- BONNEY, K. M.; LUTHRINGER, D. J.; KIM, S. A.; GARG, N. J.; ENGMAN, D. M. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 14, p. 421-447, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>. Acesso em: 24 out. 2020.
- DE PABLOS, L. M.; OSUNA; A. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. **American Society for Microbiology Journals**, [s. l.], v. 80, n. 7, p. 2258-2264, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.06225-11>. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/80/7/2258>. Acesso em: 24 out. 2020.
- DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>. Disponível em http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742016000500007&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 24 out. 2020.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900038>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900038. Acesso em: 24 out. 2020.
- FERREIRA, E. I. Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 4, n. 3, p. 225-246, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120019>. Disponível em: <http://rvq-sub.sbjq.org.br/index.php/rvq/article/view/234>. Acesso em: 24 out. 2020.
- FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. **mAbs**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1177-1194, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5058633/>. Acesso em: 24 out. 2020.

² De acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: parte I (ABNT) (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2020).

FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR. Portaria nº 206, 4 de setembro de 2018. Dispõe sobre obrigatoriedade de citação da CAPES. **Diário Oficial da União**: seção I, Brasília, n. 172, p. 22, 5 set. 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TzC2Mb/content/id/39729251/do1-%202018-09-05-portaria-n-206-de-4-de-setembro-de-2018-39729135. Acesso em: 31 out. 2020.

GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; COLLI, W. MANNING, J. E.; ALVES, M. J. M. Cloning of a Surface Membrane Glycoprotein Specific for the Infective Form of *Trypanosoma cruzi* Having Adhesive Properties to Laminin. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 6, p. 3461-3468, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.6.3461>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9920891/>. Acesso em: 24 out. 2020.

IVERS, L. C.; RVAN, E. T. Farmacologia das Infecções e Infestações Parasitárias. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, AE. J.; ARMSTRONG, E. J. **Princípios Fundamentais de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 35, p. 598-607.

KHUSAL, K. G.; TONELLI, R. R.; MATTOS, E. C.; SOARES, A. C.; DI GENOVA, B. M.; JULIANO, M. A.; URIAS, U.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* into mammalian cells. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 155–165, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4172-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-014-4172-6>. Acesso em: 24 out. 2020.

LEMKE, T. L. Antiparasitic Agents. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITE, S. W. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 7th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 34, p. 1136.

LEVINSON, W. Protozoários do sangue e de tecidos. In: LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2016. cap. 52, p. 428-430.

LIMA, L. M. Fundamentos do metabolismo de fármacos. In: BARREIRO, E. L.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. cap. 2, p. 66-70.

MAGALHÃES, L. S.; TEIXEIRA, A. A. R.; CARNEIRO, J. L. V.; NUNES, D. N.; DIAS-NETO, E. GIORDANO, R. J. **Phage Display: Aspectos Básicos e Perspectivas Atuais**. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2016. cap. 3, p. 149-184.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **American Heart Association**, [s. l.], v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/circulationaha.106.624296>. Acesso em: 24 out. 2020.

MCADAM, A. J.; SHARPE, A. H. Doenças Infecciosas. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. ASTER, J. C. **Robbins & Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 8, p. 331-407.

NIXON, A. E.; SEXTON, D. J. LADNER, R. C. Drugs derived from phage display. **mAbs**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 73-85, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4161/mabs.27240>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929457/>. Acesso em: 24 out. 2020.

PÉREZ-MOLINA, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)31612-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)31612-4/fulltext). Acesso em: 24 out. 2020.

PHILIP, J. ROSENTHAL, M. D. Fármacos antiprotozoários. In: KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017. cap. 52, p. 932-934.

QIAGEN. The QIAexpress System. In: QIAGEN. **The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins**. 5th ed. QIAGEN, 2003. p. 15-48.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. **Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure**. In: SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D'ÁVILA-LEVY, C. M.; KNEIPP L. F.; SODRÉ, C. L. **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. New York: Springer Science & Business Media Dordrecht, 2014. cap. 1, p. 1-35.

SÁENZ-GARCIA, J. L.; YAMANAKA, I. B.; PACHECO-LUGO, L. A.; MIRANDA, J. S.; CÓRNEO, E. S.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; DE MOURA, J. F.; DA ROCHA, W. D. Targeting epimastigotes of Trypanosoma cruzi with a peptide isolated from a phage display random library. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 210, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107830>. Disponível em: [sciedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419304461?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419304461?via%3Dihub). Acesso em: 24 out. 2020.

SAKANARI, J. A.; MC KERROW, J. H. Parasitologia. In: BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2014. cap. 6, p. 724-748.

TEIXEIRA, A. A. R.; DE VASCONCELOS, V. C. S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; GIORDANO, R. J. Trypanosoma cruzi Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide

Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the gp85/Trans-sialidase Proteins. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 9, n. 9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004099>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4580646/>. Acesso em: 24 out. 2020.

THE LANCET. Chagas' disease—an epidemic that can no longer be ignored. **The Lancet**, [s. l.], v. 368, n. 9536, p. 619, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69217-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69217-9). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)69217-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)69217-9/fulltext). Acesso em: 24 out. 2020.

THE NOBEL PRIZE. **Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2018**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/>>. Acesso em: 24 out. 2020.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Agência USP de gestão da informação acadêmica. **Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: parte I (ABNT)**. 4. ed. rev. São Paulo: AGUIA, 2020. 76 p. (Cadernos de Estudos, 9). DOI: <https://doi.org/10.11606/9788573140651>. Disponível em: https://www.teses.usp.br/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=67&lang=pt-br. Acesso em: 31 out. 2020.

WEBSTER, R. Filamentous Phage Biology. In: BARBAS, C. L.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K. SILVERMAN, G. J. **Phage Display Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001. cap. 1, p. 15-20.

WETZEL, D. M.; PHILLIPS, M. A. Quimioterapia da amebíase, giardíase, tricomoníase, leishmaniose e outras infecções por protozoários. In: BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas e terapêuticas de Goodman & Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2019. cap. 54, p. 1217-1232.


Assinatura da aluna
 Isabella Paulino Otvos
 03/11/2020


Assinatura do orientador
 Ricardo José Giordano
 03/11/2020