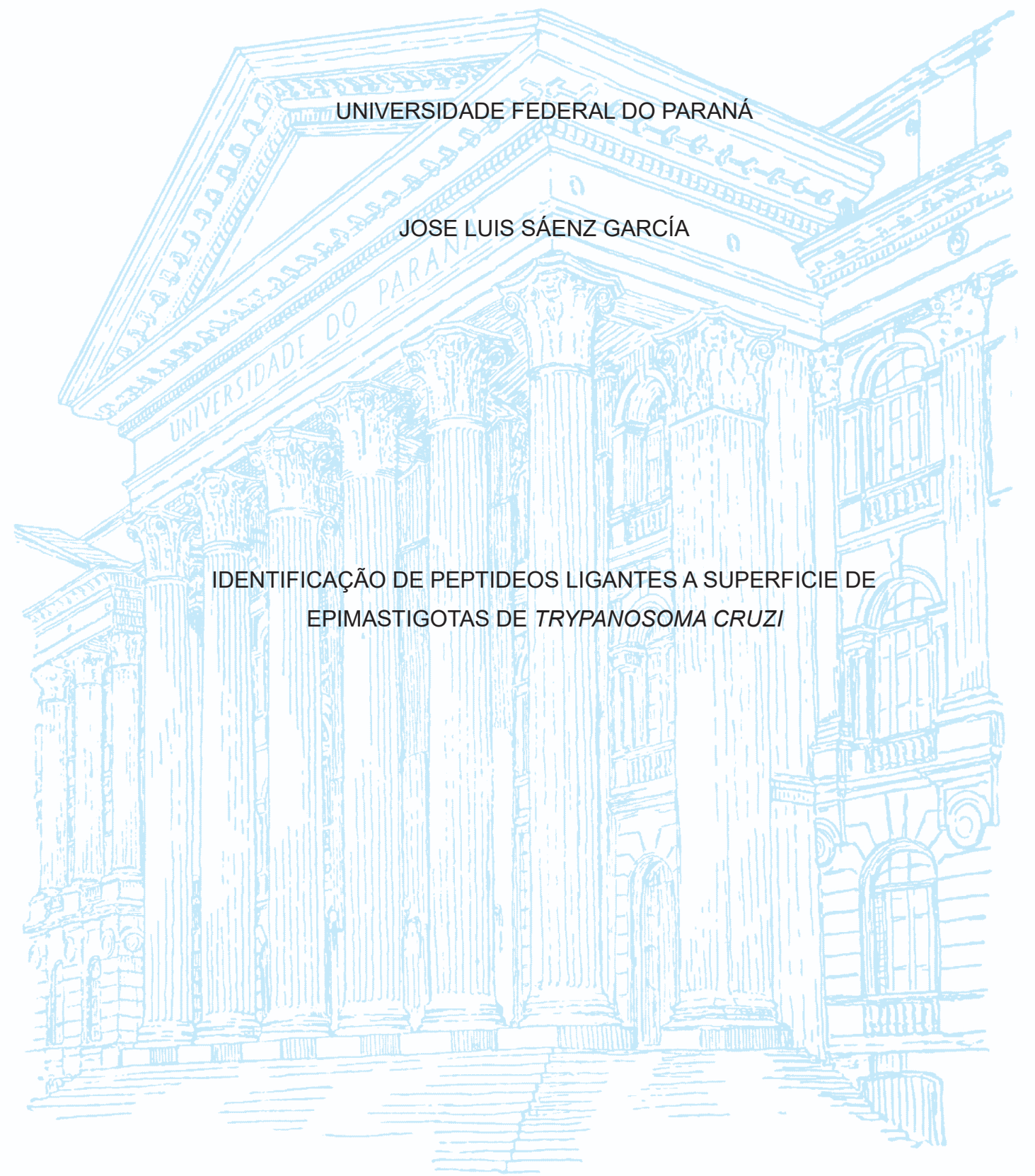




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSE LUIS SÁENZ GARCÍA

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTIDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE
EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

CURITIBA

2018

JOSE LUIS SAENZ GARCIA

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTIDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE
EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao curso de Pós- Graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Coorientador: Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Saenz Garcia, Jose Luis

Identificação de peptídeos ligantes a superfície de epimastigotas de
Trypanosoma cruzi. / Jose Luis Saenz Garcia. – Curitiba, 2018.
105 p.: il.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Coorientador: Juliana Ferreira de Moura

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências -
Bioquímica.

1. Clonagem 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Peptídeos I. Título II. Rocha,
Wanderson Duarte da III. Moura, Juliana Ferreira de IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192456

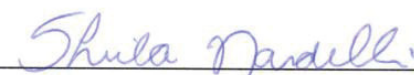
TERMO DE APROVAÇÃO

JOSE LUIS SAENZ GARCIA

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação desenvolvida sob a orientação do Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha (UFPR) e coorientação da Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira de Moura (UFPR) aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof. Dr. WANDERSON DUARTE DA ROCHA - Orientador
UFPR


Prof.^a Dr.^a SHEILA CRISTINA NARDELLI
(ICC)


Prof.^a Dr.^a SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
(UFPR)

Curitiba, 28 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Wanderson Duarte DaRocha, por me aceitar como seu orientado, e me guiar durante estes dois anos, no seu laboratório, um lugar cheio de ideias e conversas científicas.

À professora Juliana Ferreira de Moura, do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, que sempre esteve presente para me ajudar, sempre que eu precisei.

Ao professor Gláucio Valdemeri e ao estudante de doutorado Valter Baura, pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo e purificação de proteínas.

Ao pessoal do laboratório GFP que contribuíram muito com a minha formação, agradeço muito toda a ajuda e companheirismo de vocês. Principalmente ao Lisandro, pela ajuda com as metodologias de biologia molecular e a amizade.

Ao pessoal de laboratório de Imunoquímica, Andrés pela assessoria na realização dos experimentos com *Western Blot* e ELISA, a Isabel, Karla e Sabrina pela ajuda com os experimentos de *biopanning* e purificação de proteínas.

Ao pessoal do grupo de fixação de nitrogênio, os quais amavelmente, durante todo o período de estudo, nos emprestaram equipamentos e forneceram reagentes e materiais, que foram de grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação, e principalmente a cada brasileiro que contribuiu diretamente ou indiretamente para eu poder realizar meus estudos, agradeço muito, o sentimento é como um abraço entre povos irmãos.

RESUMO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é transmitida por insetos da família Reduviidae. Uma vez que o tratamento convencional com drogas nitro-heterocíclicas mostra reações adversas graves e eficiência questionável, diferentes grupos testaram abordagens baseadas em polipeptídeos para interferir com o ciclo celular do parasito em outros Tripanosomatídeos. Por exemplo, os *nanobodies* contra VSG de *T. brucei* estão sendo expressos em bactérias simbiotes com o objetivo de bloquear a transmissão do parasito, ou usado para melhorar a entrega do fármaco, combinando-os com nanopartículas ou peptídeos líticos. Essas estratégias são apoiadas pelo fato de que os componentes de superfície são candidatos para desenvolver ligantes de superfície para prejudicar a função, pois podem atuar como fatores de virulência. Neste trabalho, usamos uma abordagem de *phage display* para identificar derivados de peptídeos de duas bibliotecas de peptídeos, LX15 (15 aa) e LX8CX8 (17 aa) (onde X corresponde a qualquer aminoácido). Depois de testar diferentes condições de *biopanning* usando epimastigotas vivos ou fixados, nós sequenciamos 10 clones que codificam o mesmo polipeptídeo, aqui chamado EPI18. O bacteriófago que codifica EPI18 liga-se a epimastigotes de cepas distintas. Para confirmar estes resultados, este polipeptídeo foi sintetizado e biotinilado para realizar ELISA, citometria de fluxo e análises de microscopia confocal. Nossos ensaios mostram a especificidade e capacidade de ligação para a superfície de epimastigotes em comparação com o peptídeo não relacionado. Também isolamos bacteriófagos de uma biblioteca de peptídeos de bacteriófagos estruturalmente semelhantes (LX15), através do sequenciamento de 30 clones, identificamos 13 sequências diferentes e 4 motivos conservados, sendo que um desses motivos identificados compartilha similaridade com o péptido EPI18. Vários peptídeos identificados (EPI18 e de LX15) apresentaram semelhanças com proteínas lipocalinas, que podem ter relevância na biologia da interação, contudo isto deve ser testado. Esses resultados sugerem que os peptídeos identificados aqui possam ter potenciais aplicações biotecnológicas, como estratégias baseadas em peptídeos para controlar a transmissão do parasito.

Palavras-chave: *Phage display. Trypanosoma cruzi. peptídeo.*

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by insects from Reduviidae family. Since the conventional treatment with nitroheterocyclic drugs shows serious adverse reactions and questionable efficiency, different groups have tested polypeptide-based approaches to interfere with parasite cell cycle in other Trypanosomatids. For example, nanobodies against *T. brucei* VSGs are being expressed in endosymbiont bacteria aiming to block parasite transmission or used to improve drug delivery by combining them to nanoparticles or lytic peptides. These strategies are supported by the fact that surface players are candidates to develop surface ligand to impair their function since they may act as virulence factors. In this work, we used a phage display approach to identify peptides derivative of two peptide libraries, LX15 (15 aa) and LX8CX8 (17 aa) (where X corresponds to any amino acid). After testing different *biopanning* conditions using live or fixed epimastigotes, we sequenced 10 clones encoding the same polypeptide, named here as EPI18. The bacteriophage encoding EPI18 binds to epimastigotes from distinct strains. To confirm these results this polypeptide was synthesized and biotinylated to perform flow cytometry and confocal microscopy analyses. Our preliminary assays show its specificity and binding capacity towards to epimastigotes surface compared to unrelated peptide. We also isolated bacteriophages from a similar phage display peptide library (LX15), through sequencing of 30 clones, we identified, 13 different sequences and 4 conserved motifs, one of these identified motifs shares similarity with of EPI18 peptide. Lipocalins proteins were identified in bioinformatics analysis as corresponding sequences of 6 of our identified peptides, however its relevance needs to be addressed. These results suggest that the peptides identified here may have potential biotechnological applications such as peptide-based strategies to control parasite transmission.

Key words: *Phage display. Trypanosoma cruzi. peptide.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 3. Representação esquemática das estratégias desenvolvidas para atingir tripanosomatídeos.....	21
Figura 4. Representação esquemática da estratégia de <i>biopanning</i>	29
Figura 5. Eficiência de recuperação de bacteriófagos em diferentes condições de <i>biopanning</i> com epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	37
Figura 6. Evolução da eficiência de recuperação de fagos a cada <i>biopanning</i> com a biblioteca L _{X8CX8}	39
Figura 7. Esquema representando os sítios de alinhamentos dos iniciadores no genoma viral e os produtos de PCR de alguns clones amplificados da última etapa de <i>biopanning</i> com a biblioteca L _{X8CX8}	40
Figura 8. Representação do alinhamento das 10 sequências de clones obtidos de forma aleatórias dos pools de bacteriófagos isolados dos <i>biopanning</i> com epimastigotas (Dm28c e Y) procedentes da biblioteca de bacteriófagos L _{X8CX8}	41
Figura 9. Estrutura terciária predita por Phyre2 das sequências de proteínas retornadas da busca com o algoritmo BLASTp, quando comparadas as bases de dados de triatomíneos com a sequência do clone EPI18.....	43
Figura 10. Ensaios de ligação do bacteriófago EPI18 em epimastigotas.....	44
Figura 11. Clone EPI18 interage de forma menos eficiente a tripomastigotas metacíclicos da cepa Y.....	45
Figura 12. Ensaio de ELISA com bacteriófagos e células fixadas de 2 cepas e 1 clone diferentes de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 13. Capacidade de ligação do peptídeo sintético a superfície de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania major</i>	47
Figura 14. O alvo de EPI18 é mais expresso em epimastigotas do que tripomastigotas metacíclicos.....	49
Figura 15. O peptídeo EPI18 interage com a superfície de parasitos epimastigotas da cepa Y.....	50

Figura 16. Cálculo de IC50 do peptídeo EPI18.....	51
Figura 17. Estratégia, clonagem, expressão e purificação de EPI18 fusionado a proteína GST.....	53
Figura 18. Western blot de extrato de proteínas de parasitos previamente incubados com proteínas GST e GST-1X.....	54
Figura 19. <i>Biopanning</i> com biblioteca LX15.....	55
Figura 20. Análises das sequências obtidas no biopanning da biblioteca LX15.....	57
Figura 21. Localização dos motivos conservados encontrados em peptídeos de clones da biblioteca LX15.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais proteínas de membrana de <i>T. cruzi</i>	5
Tabela 2. Meios de cultura utilizados para os diferentes organismos que foram cultivados durante a realização deste trabalho.....	24
Tabela 3. Reagentes utilizados neste trabalho.....	24
Tabela 4. Identificação de prováveis proteínas envolvidas na interação parasito::hospedeiro invertebrado, comparado o peptídeo EPI18, com base de dados de triatomíneos.....	42
Tabela 5. Frequências dos peptídeos identificados na etapa de sequenciamento de clones isolados da biblioteca LX15.....	57
Tabela 6. Identificação de prováveis proteínas envolvidas na interação parasito::hospedeiro invertebrado, comparando os clones isolados da biblioteca LX15, com a base de dados de triatomíneos.....	59

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	2
2.1.2	ORGANIZAÇÃO CELULAR.....	2
2.2	DOENÇA DE CHAGAS	9
2.3	TRATAMENTOS DA DOENÇA.....	10
2.4	ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS PARA ALVEJAR TRIPANOSOMATÍDEOS.....	12
2.4.2	<i>NANOBODIES</i> : INCREMENTANDO AS TECNOLOGIAS BASEADAS EM POLIPETÍDEOS NO CONTROLE DE PARASITOS	14
2.4.3	TERAPIAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS CAPAZES DE PENETRAR EM CÉLULAS	17
2.4.4.	OUTROS PEPTÍDEOS PROMISSORES. A TÉCNICA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> FOI UTILIZADA NO ESTUDO DAS TRANSIALIDASES.	18
2.4.5	PARATRANSGÊNESE: UMA PROPOSTA DE CONTROLE DA TRANSMISSÃO DE ORGANISMOS PATOGÊNICOS	19
3.	JUSTIFICATIVA.....	22
4.	OBJETIVO GERAL	23
4.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1	REAGENTES E MEIOS DE CULTIVO	24
5.3	BACTÉRIAS.....	25
5.4	<i>BIOPANNING</i>	26
5.5	AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE BACTERÍÓFAGOS L _{X15} E L _{X8CX8} E CLONES ISOLADOS DOS <i>BIOPANNING</i>	26
5.6	AMPLIFICAÇÕES DO DNA DE BACTERÍÓFAGOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES AMPLIFICADOS .	28
5.7	ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.	29
5.8	ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO CLONE EPI18 IDENTIFICADO NO SEQUENCIAMENTO.....	30
5.9	ELISA COM CÉLULAS FIXADAS DE <i>T. CRUZI</i> E <i>LEISHMANIA MAJOR</i> PARA LIGAÇÃO DO CLONE EPI18 E PEPTÍDEO SINTÉTICO EPI18.....	30

5.10	CITOMETRIA DE FLUXO.....	31
5.11	MICROSCOPIA CONFOCAL	32
5.12	IC 50 DO PEPTÍDEO EPI18.....	32
5.13	CONJUGAÇÃO DA SEQUÊNCIA EPI18 COM A PROTEÍNA GST	32
5.13.1	CONFIRMAÇÃO DAS PROTEÍNAS CONJUGADAS GST COM SEQUÊNCIAS EM TANDEM DO CLONE EPI18.	33
5.14	ENSAIOS DE LIGAÇÃO COM A PROTEÍNA GST E GST-1X::EPI18	33
5.15	SDS-PAGE DO EXTRATO PROTEICO TOTAL DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34
5.16	<i>WESTERN BLOT</i> DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34
6.	RESULTADOS	35
6.1	PADRONIZAÇÃO DO BIOPANNING.....	35
6.2	SELEÇÃO DE BACTERIÓFAGOS DA BIBLIOTECA <i>L_{X8CX8}</i> REATIVOS COM EPIMASTIGOTAS - <i>BIOPANNING L_{X8CX8}</i>	38
6.3	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS CLONES ISOLADOS. ...	39
6.4	EFICIÊNCIA DA LIGAÇÃO DO CLONE EPI18 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	43
6.5	EFICIENCIA DE LIGAÇÃO DO PEPTIDEO SINTÉTICO EPI18	47
	A).....	49
6.6	A LIGAÇÃO DE EPI18 A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS INTERFERE EM SEU DESEMPENHO?	51
6.7	PROTEÍNAS DE FUSÃO A EPI18 SÃO CAPAZES DE INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS?	51
6.8	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> A PARTIR DA BIBLIOTECA DE BACTERIÓFAGOS <i>L_{X15}</i>	54
7.	DISCUSSÃO	60
8.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	69
9.	REFERÊNCIAS	70
10.	ANEXOS	87

1.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, a doença é considerada um problema de saúde pública na América Latina. De acordo com a organização mundial da saúde, existem aproximadamente de 6-8 milhões de pessoas infectadas e 21 zonas consideradas de risco endêmico (OMS, 2016). Para o tratamento da doença existem disponíveis duas drogas com eficácia questionável, além de apresentar efeitos adversos graves e um período de tratamento longo, levando a altos custos para os sistemas de saúde pública em países endêmicos. Políticas como a iniciativa do cone sul, baseadas na aplicação de inseticidas e melhoramento das moradias, permitiu diminuir drasticamente a taxa de transmissão vetorial, porém ainda existem áreas hiperendêmicas para o inseto vetor como a região do Chaco na Bolívia (Samuels *et al.*, 2013). O ressurgimento de outras doenças transmitidas por vetores, como leishmaniose cutânea na América central e a febre amarela no Brasil, demonstra o risco de surtos, que no caso da doença de Chagas pode ser devido ao desmatamento, migração de pacientes infectados e infecções por outras vias de transmissão como a oral (alimentos contaminados). Estes aspectos apontam a importância do seguimento epidemiológico e a necessidade de investir em pesquisa para busca de novos tratamentos e métodos diagnósticos, diferentemente de outras doenças transmitida por vetores como o ZIKA e Dengue, pois existem tentativas recentes para o controle através de vacinas que tem demonstrado relativo sucesso. (Da Costa *et al.*, 2014 e Makhluף; Shresta, 2018). Já para *T. cruzi* o desenvolvimento de uma vacina tem sido um desafio, devido a provável participação de processos autoimunes, além da possibilidade de variabilidade antigênica das proteínas de superfície (MASP) (Rodríguez-Morales *et al.*, 2015). A estratégia de *phage display* tem sido útil para encontrar peptídeos alvejantes de células principalmente em terapia oncológica, que possam ser conjugados a drogas potencializando sua efetividade e reduzindo toxidez. A identificação desses peptídeos para tratamento de doenças parasitárias e/ou profilaxia são incipientes. Neste trabalho pretendemos identificar peptídeos alvejem formas epimastigotas de *T. cruzi*, permitindo a exploração das metodologias baseadas em peptídeo para controle da transmissão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *TRYPANOSOMA CRUZI*

Trypanosoma cruzi é considerado um eucariota inferior devido à presença de um núcleo organizado cercado por uma membrana, presença de mitocôndria e um citoplasma com organelas características de eucariotas, porém apresentam algumas características semelhantes com os procariotas como a transcrição policistrônica. *T. cruzi*, assim como outros membros da família trypanosomatidae, apresenta características únicas como: a presença de cinetoplasto (região próxima a base do flagelo que contém o DNA mitocondrial acumulado, o kDNA), flagelo único, mecanismos de edição dos RNAs mitocondriais, e um genoma com abundantes sequências repetitivas com elevado número de genes que codificam famílias multigênica (El-Sayed 2005; Read *et al.* 2016). Devido a variabilidade genômica e fenotípica das cepas de *T. cruzi*, foi proposta a classificação em seis DTUs (TcI à TcVI) (*Discrete Typing Units*). Esta classificação foi baseada na distribuição geográfica, hospedeiro de origem e marcadores genéticos (Zingales *et al.*, 2009, 2012).

2.1.2 ORGANIZAÇÃO CELULAR

O protozoário é um parasito, com um ciclo heteróximo passando por hospedeiros mamíferos e inseto. Neste ciclo, o parasito sofre mudanças morfológicas e bioquímicas reconhecidas pelas diferentes 4 formas principais, são epimastigotas (formas replicativas do inseto), tripomastigotas metacíclicas (a forma não replicativas e infectantes excretada nas fezes e urina do inseto), amastigota (a forma intracelular presente no hospedeiro mamífero), e as formas tripomastigotas sanguíneas, (forma facilmente detectada na circulação sanguínea na fase aguda da doença) (Umekita *et al.*, 1999). O parasito possui organelas comuns dos eucariotas como mitocôndria (contudo é única e ramificada) (Docampo; Lukeš, 2012), núcleo, flagelo, complexo de Golgi, mas também outras organelas próprias da espécie, como acidocalcisomos organelas esféricas essencialmente ácidas, onde se estocam pirofosfatos e polifosfatos complexado com cálcio e estão envolvidas em processo de

osmoregulação, (Moreno; Docampo 2009), glicossomo (organela esférica com funções similares aos peroxissomos e contém a maioria das enzimas da via glicolítica e de outras vias), (Oppenheimer 1987 e Oppenheimer; Borst 1977), reservosomas (estoque de macromoléculas endocitadas) (Sant'Anna *et al.*, 2008 e Soares; De Souza 1991) e cinetoplasto (De Souza *et al.*, 2002, 2009) Para melhor visualização dessas estruturas e organelas veja a figura 1.

A membrana plasmática de *T. cruzi* pode ser subdividida em quatro regiões principais: corpo celular, citóstoma, flagelo e bolsa flagelar. A estrutura e rigidez da célula são definidas pelos microtúbulos subpeliculares localizados embaixo da membrana plasmática, a bolsa flagelar é uma invaginação da membrana onde se origina o flagelo do parasito, também é o sitio que não possui microtúbulos subpeliculares. Esta característica da bolsa flagelar permite um tráfego maior de micronutrientes por endocitose mediada por clatrina e exocitose. O citóstoma e a citofaringe são invaginações de membrana próxima a bolsa flagelar que pertencem ao sistema de endocitose do parasito e que possuem comunicação física com a bolsa flagelar. Esta organela não é comum aos demais tripanosomatídeos. (Okuda *et al.*, 1999)

O flagelo destes parasitos é uma estrutura única que permite o movimento do parasito, e é formado por 9 pares de microtúbulos periféricos e um par central. O flagelo é conservado através do ciclo de vida, diminuindo de tamanho nos amastigotas (Souza, 2009). Contudo, seu flagelo também apresenta uma estrutura proteica denominado bastão paraflagelar, composto principalmente pelas proteínas PFR1-4 que permitem a ligação ao axonema. A interrupção desses genes por edição com CRISPR-Cas9 confirmou a importância destas proteínas na motilidade do parasito (Lander *et al.*, 2015).

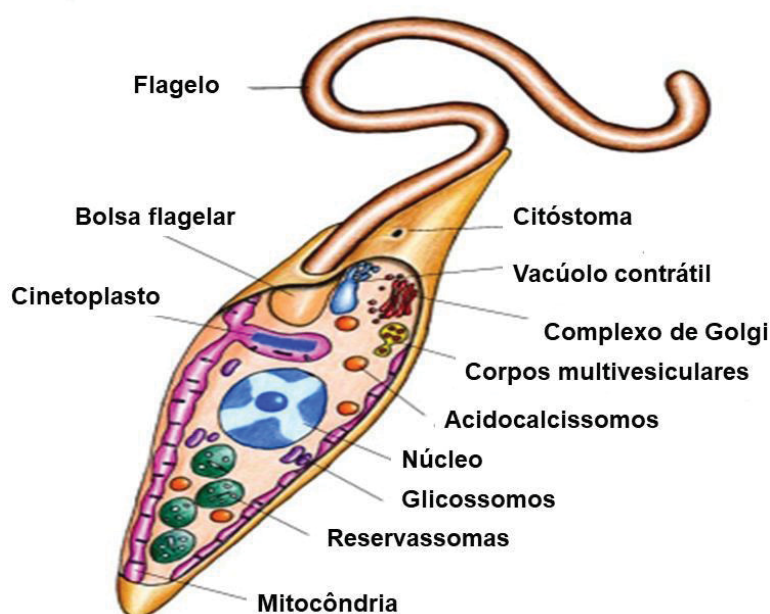


Figura 1. Representação esquemática de um epimastigote de *Trypanosoma cruzi*

FONTE: Adaptado de (Girard-Dias 2009).

NOTA: Esquema ilustrando as diferentes organelas e a localização subcelular no protozoário *T. cruzi*, na região anterior está localizado o flagelo e na região posterior, os microtúbulos subpeliculares.

Como mencionado anteriormente, o desenvolvimento do parasito ou ciclo de vida acontece entre o hospedeiro mamífero e o inseto vetor. Insetos hematófagos alimentam-se de sangue de mamíferos ou humanos infectados os quais podem apresentar tripomastigotas sanguíneos circulantes. Os tripomastigotas adquiridos no hábito hematofágico dos barbeiros migram para o intestino anterior diferenciando-se em esferomastigotas, para logo migrar para o intestino médio onde se transformam em epimastigotas. Os epimastigotas se replicam por fissão binária e logo se aderem nas células epiteliais do intestino posterior e reto onde começa o processo de metaciclogênese que originará os tripomastigotas metacíclicos. Estes tripomastigotas se desprendem do intestino e são excretadas com as fezes e urinas. Durante a alimentação o inseto deposita as fezes perto do sitio da picada, conjuntivas ou mucosas expostas, sendo que a ferida feita pelo inseto vira uma porta de entrada para a infecção do novo hospedeiro ou o transporte mecânico a mucosas e conjuntivas de fezes contaminadas (Tyler; Engman 2001). Este ciclo esquematizado pode ser visto na figura 2.

Neste processo de alternância em hospedeiro/ambientes o parasito precisa se adaptar em vários aspectos (p.ex.: morfologia, metabolismo, virulência, etc.). Uma alteração importante nesse processo de adaptação é a dinâmica de expressão de proteínas de superfície, que estão compiladas na tabela 1.

Tabela 1. Principais proteínas de membrana de *T. cruzi*.

Gene	Descrição	Isoformas/cópi as	Up-regulated	Referência
Trans- sialidase	TCNA, SAPA, TS-epi (Transferênci a de ácido siálico dos glicoconjug ados do hospedeiro para as mucinas .)	TsI	TCT/EPI (TS- EPI)	Cross; Takle (1993), Buschiazzo <i>et al.</i> (2002) Briones <i>et al.</i> (1995)
	GP85, GP83, Tc85, ASP, GP82, GP90 (Ligação e invasão a células)	TsII	AMA/TCT/ MT	Low; Tarleton (1997), Santos <i>et al.</i> (1997), Giordan o <i>et al.</i> (1999), Kahn <i>et al.</i> (1991), Giordan o <i>et al.</i> (1999), Malaga; Yoshida (2001), Teixeira; Yoshida (1986), Correa <i>et al.</i> (2013)
	CRP, FL160, CEA, and TESA (inibição do sistema de	TsIII	TCT	Matsumoto <i>et al.</i> (2002), Norris <i>et al.</i> (1991), Jazin

	complement o)			<i>et al.</i> (1995).
	TsTc13 (Função desconhecida)	TsIV	MT	Freitas <i>et al.</i> (2011).
MASP	<i>Mucin Associated surface protein</i> (Variabilidade e antigénica, interação parasito- hospedeiro?)	-	MT /TCT	Bartholomeu <i>et al.</i> (2009), Dos Santos <i>et al.</i> (2012).
Amastina	Proteína trans- membrana	Δ	AMA	De Paiva <i>et al.</i> (2015), Cruz <i>et al.</i> (2012),
		B	EPI /MT	Kangussu-Marcolino <i>et al.</i> (2013).
GP63	Metallo- protease	TcGP63-I	EPI/AMA/MT	Llewellyn <i>et al.</i> (2015), Kulkarni <i>et al.</i> (2009), Cuevas <i>et al.</i> (2003).
		TcGP63-II	AMA/EPI/TCT	
Mucin	Aceptores de ácido siálico mediado pela enzima TS.	TcMUC	AMA/TCT	Di Noia <i>et al.</i> (1995), Buscaglia <i>et al.</i> (2006), Schenkman <i>et al.</i> (1993).
		TcSMUG	EPI/MT	
Cruzipain -2	Cisteína protease	N-cruzipain	EPI	Dos Reis <i>et al.</i> (2006), Eakin <i>et al.</i> (1992), (Parussini <i>et al.</i> , 1998)
		R-cruzipain	EPI/TCT/AMA	

Existem outros hospedeiros mamíferos alternativos que fazem parte do ciclo selvático da doença, atuando como reservatórios, sendo uma fonte potencial para iniciar epidemias em áreas urbanas ou zonas de desmatamento. Entre os mamíferos que funcionam como reservatórios se destacam: *Didelphis marsupialis* (Gambá-comum), *Carollia perspicillata* (morcego), *Potos flavus* (Jupará), *Leontopithecus rosalia* (Mico-leão-dourado) e *Procyon lotor* (guaxinim), outras espécies podem ser consultadas na tabela suplementaria do artigo de (Brenière, Waleckx, e Barnabé 2016).

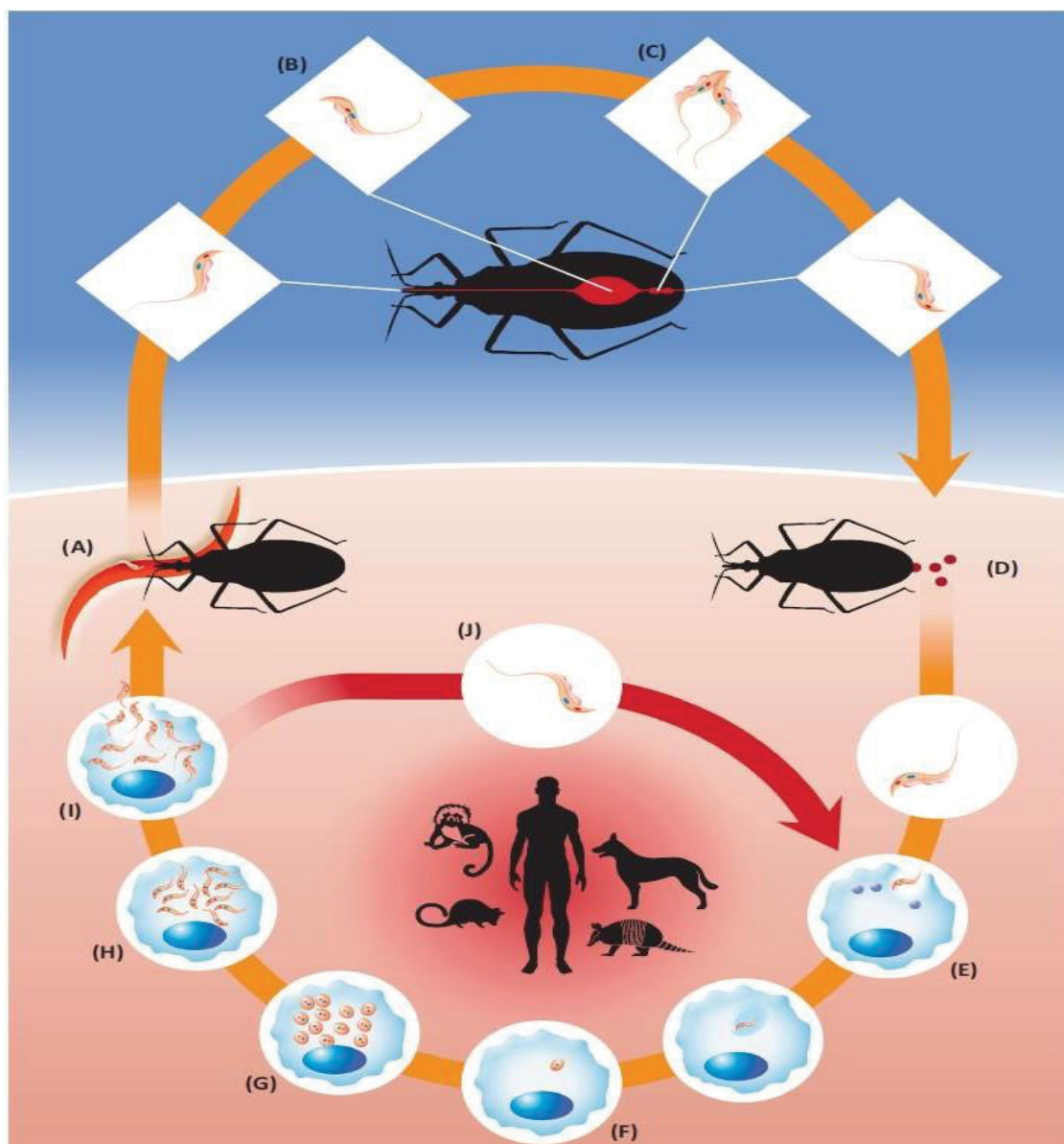


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Adaptado de (Perez, Lymbery, e Thompson 2014)

NOTA: (A) insetos triatomíneos ingerem formas tripomastigotas sanguíneas que passam pelo intestino anterior do inseto e no intestino médio, se diferenciam em epimastigotas (B), no intestino médio começam a replicar-se por fissão binária (C), os parasitos migram para o intestino posterior do inseto, onde se aderem e passam pelo processo de metaciclogênese, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos, os quais são excretados junto com as fezes e urina (D), os parasitos infectam o hospedeiro pelo sítio da picada ou por entrada através de mucosas intactas como conjuntiva e oral. O parasito pode infectar a maioria das células nucleadas (E). Dentro da célula os parasitos, inicialmente, estão envolvidos pelo vacúolo parasitóforo, de onde escapam e se diferenciam em amastigotas (F). As amastigotas replicam no citoplasma por fissão binária (G) e se diferenciam para tripomastigotas sanguíneos, o processo se completa com a lise celular e a liberação das tripomastigotas na corrente sanguínea (I) onde o ciclo reinicia.

2.2 DOENÇA DE CHAGAS

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (Chagas, 1909), é um protozoário flagelado pertencente à ordem kinetoplastida e a família tripanosomatidae. Nesta família existem outros parasitos flagelados como *Leishmania sp.* e *Trypanosoma brucei* que causam doenças em humanos e animais, que juntamente com a Malária e outras doenças negligenciadas afetam aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo (OMS, 2018).

Atualmente a doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países de América Latina abrangendo desde o centro até o sul das Américas nas regiões tropicais e subtropicais (Short *et al.*, 2017). No Brasil existem aproximadamente 4.5 milhões de pessoas infetadas, principalmente na região norte e nordeste (Martins-Melo *et al.*, 2014). Essas regiões são propícias para o desenvolvimento do inseto vetor, sendo a transmissão vetorial é a forma clássica de transmissão da doença. No entanto, outras formas de transmissão como à infecção por via oral, congênita, através de transfusões de sangue contaminadas, transplantes de órgãos de pacientes infetados e através da transmissão sexual já foram reportadas, (Araujo *et al.*, 2017; Bern, 2015; Kolliker-Frers *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2011). A identificação de casos em países não endêmicos é cada vez mais comum (Norman *et al.*, 2010 e Pérez- Molina *et al.*, 2012).

Os insetos vetores da doença são hematófagos da família *triatomínae*, os quais são encontrados em moradias urbanas e rurais (Barrett *et al.* 2003). Pelo menos 20 espécies são capazes de transmitir a doença e mais de cem espécies consideradas como potenciais vetores, e que apresentam ampla distribuição geográfica abrangendo a maioria da América Latina. Entre os gêneros de maior relevância epidemiológica consideram-se os gêneros *Rhodnius* (*Rhodnius prolixus*), *Triatoma* (*Triatoma dimidiata* e *Triatoma Infestans*), e *Panstrongylus* (*Panstrongylus megitus*) (Gourbière *et al.*, 2012).

A doença pode se manifestar entre 5-14 dias após a infecção, sendo que na fase aguda, os pacientes podem apresentar febre de intensidade

variável, mal-estar, inflamação de gânglios e inflamação no sítio da picada, o sintoma é chamado de chagoma, uma lesão que gera edema local no sítio de entrada do parasito. Além desses sintomas, em alguns casos quando ocorre infecção das conjuntivas oculares, acontece edema inflamatório nas mucosas denominado sinal de Romanha (Zeibig, 2014).

Após a fase inicial da doença, cerca de 70% dos indivíduos infectados passam para uma fase crônica indeterminada. Nesta fase as manifestações da doença estão ausentes e a confirmação é feita por sorologia ou pela técnica de reação em cadeia da polimerase, estes pacientes podem demorar mais de 10-30 anos em mostrar sintomas. Os restante 30% dos infectados desenvolvem sintomas na fase crônica dita determinada, ou seja, para desenvolver complicações cardíacas (Megalocardia) e/ou digestivas (Megacólon) (Dias; Coura, 1997).

A mortalidade pela doença de Chagas acontece principalmente na fase crônica, e o diagnóstico tardio, muitas vezes até a apresentação das complicações causa uma maior sobrecarga para os serviços de saúde, em custos de atenção terciária (cirurgias, marca-passos e tratamento paliativo), além de ser uma causa importante de deficiência, que diminui a produtividade em países endêmicos. (De Araújo *et al.*, 2014).

2.3 TRATAMENTOS DA DOENÇA

Para o tratamento existem somente duas drogas com eficácia moderada e relativa toxicidade (Benznidazol e Nifurtimox), com a desvantagem de precisar períodos longos de tratamento, de aproximadamente 60-90 dias (Viotti *et al.*, 2009). Os fatos mencionados enfatizam a necessidade de continua pesquisa e desenvolvimento de novas terapias, que permitam encurtar os tempos de tratamento e diminuir as reações adversas derivadas do tratamento, o que influenciaria a redução das taxas de abandono do tratamento (Olivera *et al.*, 2017).

Benznidazol é um derivado nitroimidazólico, e é o tratamento de primeira linha para a doença de Chagas, apesar de que os mecanismos ainda não serem completamente entendidos, porém aparentemente aumenta o estresse

redox no parasito, (Wilkinson *et al.*, 2011). Este medicamento é considerado o de maior eficácia para o tratamento da doença de Chagas, embora apresente reações adversas desde dermatite como a reação mais leve e frequente, neuropatia periférica pode apresentar-se um tempo depois do início do tratamento, a supressão da medula óssea é a reação adversa mais grave, porém a interrupção do tratamento é suficiente para atenuar as complicações (Hasslocher-Moreno *et al.*, 2012).

Nifurtimox é um derivado nitrofurano que promove à produção de radicais livres que danificam o parasito (Wilkinson; Kelly, 2009). Os pacientes tratados atingem uma taxa de cura entre 60-90% na fase aguda, as reações adversas mais frequentes são as alterações gastrointestinais (náusea e vômito) apresentando-se em 50% dos pacientes, transtornos neurológicos como irritabilidade, desorientação, tremores e polineuropatia periférica. (Fuentes B *et al.*, 2012)

Ambas as drogas são consideradas pró-drogas que precisam ser ativadas por nitroreductases do parasito (Wilkinson *et al.*, 2011), e são recomendadas para o tratamento da doença de Chagas na fase aguda. Nesta fase é possível a eliminação dos parasitos, diminuição dos sintomas e prevenção das complicações tardias. No entanto na etapa crônica da doença o tratamento embora elimine os parasitos detectáveis por técnicas convencionais (PCR, sorologia), aparentemente existe uma população residual localizada em tecidos de órgãos como o coração. Os pacientes não mostram melhora clínica ou diminuição das complicações em longo prazo segundo um recente estudo (Morillo *et al.*, 2015). Apesar das taxas altas de reações adversas, não existem trabalhos correlacionando mortes com o tratamento, (Pinazo *et al.*, 2010 e Viotti *et al.*, 2009). Recentemente uma droga em fase de ensaio clínico, o posaconazole, se mostrou ineficaz comparado com benznidazol para diminuir a parasitemia em pacientes assintomáticos, limitando ainda mais as drogas disponíveis para o tratamento. Um melhor entendimento da fase crônica da doença e a síntese e pesquisa de novas drogas para o tratamento são evidentemente necessárias (Morillo *et al.*, 2017).

Atualmente novas drogas estão sendo testadas em ensaios clínicos como posaconazole e fosravuconale, além da identificação de alvos

interessantes para o desenvolvimento de drogas como a tripanothione reductase e cruzipaina, os quais inibidores seriam convenientes pela ausência em mamíferos, apesar do anteriormente dito os resultados dos ensaios pré-clínicos não tem sido promissor, (Morillo *et al.*, 2017) investimento e pesquisa para procurar novas drogas é uma questão relevante para os países endêmicos (Field *et al.*, 2017).

2.4 ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS PARA ALVEJAR TRIPANOSOMATÍDEOS.

Diante das dificuldades expostas para o tratamento ou desenvolvimento de vacinas, existem esforços para desenvolver novas ferramentas para o tratamento das doenças causadas por Tripanosomatídeos. As estratégias são concebidas tentando contornar algumas características biológicas dos tripanosomatídeos como, a camada de proteínas de membrana com uma alta variabilidade antigênica e a capacidade destes parasitos de dirigir a produção de anticorpos não protetores. Nesse contexto, a obtenção de polipeptídeos isolados por *phage display* ou outras fontes, como *nanobodies* e scFv (*single chain variable fragment*) estão sendo uma alternativa para aprimorar os mecanismos de controle e/ou tratamento de doenças infecciosas (Hurwitz *et al.*, 2011).

2.4.1 UTILIZAÇÃO DE SCFV (SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENT) COM FINS TERAPÊUTICOS

A estrutura clássica das imunoglobulinas (Ig) consiste numa proteína de alto peso molecular (aproximadamente 150 kDa) abundante em soro de animais vertebrados. Essas moléculas são compostas por duas cadeias pesadas (CH) e duas cadeias leves (CL). A cadeia pesada é composta por três regiões constantes pesadas e uma região variável pesada (VH), e a cadeia leve consiste numa região de cadeia leve constante e uma região de cadeia leve variável (VL). As regiões variáveis pesadas e leves possuem o sítio de ligação ao antígeno (porção Fab) que uma vez em interação com o alvo podem neutralizá-lo/bloqueá-lo. Sendo assim, tais moléculas quando obtidas a partir de hibridomas ou de soros policlonais têm sido utilizados em diversas terapias (Saylor *et al.*, 2009). Apesar dessa potencialidade suas aplicações podem ser

limitadas devido à dificuldade de obtenção e/ou modificação desses anticorpos (Saeed *et al.*, 2017).

A fim de ampliar/aprimorar a aplicabilidade de anticorpos nas mais diversas áreas, estes tem sido engenheirados na forma recombinante de cadeia simples (*scFv*), a partir da fusão traducional das regiões variáveis leve e pesada de uma dada molécula de imunoglobulina (anticorpo monoclonal) separados por um polipeptídeo espaçador flexível (Ahmad *et al.*, 2012). Os *scFvs* são moléculas pequenas de aproximadamente 25 kDa, e de cadeia única, o que facilita sua expressão em sistemas procarióticos nos mais variados formatos, além de apresentarem melhor difusibilidade em tecidos (Colcher *et al.*, 1998), essas regiões variáveis podem ser amplificadas a partir de cDNAs gerados, por exemplo, a partir de RNAs oriundos de hibridomas de anticorpos monoclonais previamente caracterizados por afinidade a um dado antígeno, ou mesmo em uma forma mais aleatória gerando bibliotecas de *scFvs*, a partir de linfócitos circulantes ou de baço. As bibliotecas de *scFvs* podem ser construídos utilizando vetores virais, gerando bibliotecas de *phage display* (Foroumadi *et al.*, 2018).

A tecnologia de *scFv* já foi utilizada em vários modelos, incluindo parasitos. Em *Schistosoma japonicum*, foi realizado uma tentativa de isolar *scFv* ligantes de proteínas de parasitos adultos para serem utilizadas com fins diagnósticos da doença (Hosking *et al.*, 2015). Outra abordagem já realizada, foi a produção de *scFv* por bactérias do microbioma de inseto vetor da malária, numa metodologia cunhada como paratransgênese. Nessa abordagem no controle de plasmódio, pretendia-se erradicar a transmissão da doença, pela expressão de *scFv* específico fusionado a um peptídeo lítico (escorpina) pelo simbiote *Asia sp.* de *Anopheles* contra a proteína 2-Shiva 1. Este *scFv* tem capacidade de lise dos oocinetos de *Plasmodium berguei* depois da ligação. A secreção do *scFv*:escorpina demonstrou a interrupção do desenvolvimento dos oocistos dentro dos intestinos de mosquitos (Bongio; Lampe, 2015).

Combinando a engenharia de anticorpos e a tecnologia de *phage display*, camundongos imunizados com células inteiras mortas de *Toxoplasma gondii* foram utilizados para obter o *pool* de regiões VH e VL expressos pós- imunização que foram clonados em vetores virais (bacteriófagos). Nessa

abordagem foi gerado uma biblioteca de *scFv* expressos na superfície de fago filamentoso. Com isto, foi possível obter um *scFv* contra a proteína TgMIC2 de micronema, proteína importante para infectar as células epiteliais, sendo que os autores utilizariam as moléculas identificadas para localizar os parasitos em estudos celulares (Hoe *et al.*, 2005).

A aplicação deste tipo de metodologia já foi realizada em tripanosomatídeos. Em *Trypanosoma cruzi* desenvolveu-se um *scFv* contra a proteína ribossomal (TcP2 β), que desempenha um papel importante no passo de alongamento da síntese de proteínas neste parasito. Observou-se que o *scFv*-C5 tem o potencial de reconhecer a porção C-terminal da maioria das proteínas TcP2 β de tripanosomatídeos pela conservação das sequências, além disso o *scFv* é específico para o parasito uma vez que não reconhece epítomos dos ribossomos de mamíferos (Juri Ayub *et al.*, 2005). Testes *in vitro*, deste *scFv* mostraram a capacidade de bloqueio da tradução pelo ribossomo em tripanosomatídeos, sem efeito nos ribossomos de *Rattus norvegicus*. Além disso, a expressão no formato de *intrabody* (expressão do *scFv* anti-TcP2 β pelo próprio parasito) foi capaz de afetar seu crescimento, provavelmente atenuando o parasito (Juri Ayub *et al.*, 2012).

Cabe ressaltar também que nosso grupo de pesquisa obteve *scFv* funcional anti-gp35/50 a partir do anticorpo monoclonal com o mesmo nome (Soares 2014), que recentemente foi demonstrado sua efetividade para inibir a infecção de células quando obtido na forma recombinante (Lara M. K. Demeu, comunicação pessoal).

2.4.2 NANOBODIES: INCREMENTANDO AS TECNOLOGIAS BASEADAS EM POLIPETÍDEOS NO CONTROLE DE PARASITOS

Existe uma tendência em tentar substituir anticorpos convencionais (IgG por exemplo – 150kDa) por *scFv* (25kDa) em terapias uma vez que essas são bem menores. Contudo, há a necessidade de gerar proteínas de fusão para recuperar a capacidade de ligação, que pode ser limitante. A fim de contornar esses problemas, recentemente tem sido tentado engenheirar anticorpos de camelídeos na forma de *nanobodies* (Hamers-Casterman *et al.* 1993).

Os anticorpos de camelídeos, diferente de outros anticorpos, possuem apenas cadeias pesadas, sendo que apenas uma porção de ~15kDa, os *nanobodies*, correspondem ao domínio de ligação ao antígeno, ou seja, só uma pequena cadeia polipeptídica curta é equivalente ao scFv (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Esta característica estrutural facilita o isolamento, amplificação e purificação dos *nanobodies*, e seu tamanho reduzido têm demonstrado ligação em epítomos mais conservados e uma maior afinidade para o alvo, além de apresentar melhor solubilidade. A falta da região constante (Fc) nesses *nanobodies* os tornam incapazes de ativar o complemento (Hu *et al.*, 2017).

O procedimento para obter *nanobodies* é relativamente similar com a técnica para obtenção de anticorpos monoclonais, pela necessidade de expor os camelídeos ao antígeno, isolamento das células B plasmáticas, seleção dos clones e amplificação das sequências que codificam a porção de reconhecimento do antígeno (VHH) por reação de RT-PCR. Essas sequências podem ser clonadas em vetores de expressão ou virais para serem purificadas ou para construir bibliotecas de *nanobodies* utilizando a tecnologia de *phage display* (Muyldermans, 2013).

Os *nanobodies* têm sido empregados para desenvolver sistemas de entrega de drogas em pesquisa básica e aplicada, sistemas para identificação de moléculas e receptores ao ser facilmente acoplados com cromóforos, (De Groeve *et al.*, 2010), sistemas de regulação genica como o CRE-DOG e para entrega de drogas em tecidos como o sistema nervoso no qual a difusão de drogas é limitada pela barreira hematoencefálica (Caljon *et al.*, 2012). Novamente, seu pequeno tamanho e solubilidade potencializam a entrega de drogas quando são conjugados, porém em ensaios clínicos têm demonstrado uma alta toxicidade mostrando a necessidade de serem humanizados como acontece no caso dos anticorpos monoclonais (Papadopoulos *et al.*, 2015).

A maioria de trabalhos relacionados com o uso de Nanobodies em tripanosomatídeos o *T. brucei* foi utilizado como modelo. Diversos *nanobodies* foram isolados utilizando a técnica de *phage display* e confirmada a ligação num epítomo conservado da proteína VSG (Stijlemans *et al.*, 2004), uma asparagina altamente glicosilada (GlnNAc₂-Man₅₋₉), situada embaixo da densa camada proteica formada pela região exposta da proteína VSG. Este epitopo

era estericamente impossível de ser atingido por um anticorpo convencional. A capacidade do parasito para trocar rapidamente as proteínas de membrana e as proteínas ligadas a anticorpos permite que os *nanobodies* ligados as diferentes VSG sejam endocitados e disponíveis intracelularmente no parasito (Manna *et al.*, 2014). Drogas conjugadas com esses *nanobodies* aproveitariam a eficiência de internalização para melhorar a entrega de drogas líticas para o parasito.

Entre os *nanobodies* identificados, aqueles específicos para um subtipo de VSG (AnTat1.1) demonstraram capacidade lítica, diminuindo o processo de endocitose do parasito, impedindo a captura de nutrientes levando o parasito a morte (Stijlemans *et al.*, 2011). Outro *nanobody*, Nb-An33, que não demonstrou capacidade lítica, mas conservou o grau de ligação com vários subtipos de VSG foi conjugado com um polipeptídeo derivado de ApoL-1, componente do soro humano que é tripanolítico, demonstrando uma maior sobrevivência de animais infectados em ensaios *in vivo* com uma diminuição da parasitemia (Baral *et al.* 2006). Outra estratégia foi planejada para contornar a resistência a drogas. Pentamidina é uma droga usada como segunda linha no tratamento de tripanossomíases africana, e quando conjugada ao Nb-An33 mostrou uma diminuição de 7 vezes da dose necessária para inibir o crescimento do parasito *in vitro* e uma redução de 10 vezes da dose para tratar animais infetados. Estes dados sugerem que o envio da droga via endocitose diminui a resistência em mecanismos relacionados a transportadores de membrana. Outra utilidade do *nanobody* Nb-An33 foi a capacidade que tem *in vitro* para atravessar a barreira hematoencefálica, fato importante no caso do tratamento para a meningoencefalite uma complicação frequente da tripanossomíase africana (Caljon, G *et al.*, 2012).

A enzima transialidase da família I recombinante do parasito *T. cruzi*, foi utilizada como antígeno para desenvolver uma biblioteca de *nanobodies*. Vários clones conseguiram reagir com a proteína recombinante, porém quando testados em ensaios com culturas de parasitos, os *nanobodies* não foram eficientes para inibir a função da enzima (transferência de ácido siálico). O autor comenta que provavelmente uma alta variabilidade entre cepas, e modificações pos-traducionais explicariam a dificuldade dos *nanobodies* para

inibir a enzima, reforçando a ideia de utilizar o parasito vivo ou sistemas eucariotas de expressão de proteínas para conservar as modificações pós-traducionais (Ratier *et al.* 2008).

2.4.3 TERAPIAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS CAPAZES DE PENETRAR EM CÉLULAS

Peptídeos capazes de penetrar em células (CPPs) são moléculas com capacidade de ancorar e penetrar membranas de células eucariotas. Esses peptídeos são moléculas contendo aminoácidos com carga positiva e/ou anfipáticos ou hidrofóbicos. Entre os peptídeos CPP mais estudados temos o peptídeo TAT (48-60) (48-57) isolado do vírus de HIV, penetratina isolado de *Drosophila melanogaster*, e as poliargininas, sendo que este último é um exemplo de desenho racional de CPP ao serem quimicamente sintetizados. CPPs têm sido utilizados para a entrega de moléculas com fins terapêuticos, tais como, siRNA e drogas para a células eucariotas (Guidotti *et al.*, 2017 e Rádis-Baptista *et al.*, 2017)

Em tripanosomatídeos, o peptídeo TAT (48-60) foi conjugado com outro peptídeo na tentativa de alvejar uma região da Tripanothione reductasa (TR) de *Leishmania infantum* necessária para a enzima dimerizar e ser funcional. TR é uma enzima importante para manter o ambiente redox do parasito sob controle e diminuir os danos por radicais livres. O peptídeo inibidor da dimerização da TR não produzia efeito, já que não podia atravessar a membrana. Contudo a conjugação com o peptídeo TAT aumentou a entrega no citosol do peptídeo inibidor, permitindo a entrada na célula e o efeito no sítio enzimático (Ruiz-Santaquiteria *et al.*, 2017).

Em outra tentativa conjugou-se miltefosine uma droga ativa contra *Leishmania sp.*, e um cromóforo com o peptídeo TAT (48-60) (Luque-Ortega *et al.*, 2012). O cromóforo ajudou a localizar a droga e visualizar a liberação da mesma intracelularmente, confirmando que a droga conjugada é capaz de atingir amastigotas internalizadas dentro de macrófagos. Estes resultados mostram que é possível atingir parasitos dentro de células hospedeiras, contornando uns dos maiores desafios no tratamento de parasitos intracelulares. Experimentos similares feitos com a droga paramomicine, que

tem baixa absorção via oral, demonstraram o mesmo padrão observado com miltefosine, porém não foram feitos experimentos para comprovar a melhora nos parâmetros farmacocinéticos da droga, em ensaios *in vivo* (Defaus *et al.*, 2017).

Peptídeos de fontes naturais com efeito antimicrobiano são tidos como uma das mais básicas estratégias de defesa do sistema imune, e sua importância tem aumentado para fins terapêuticos devido à crise envolvendo a resistência aos antibióticos. De forma geral, os microrganismos têm dificuldade para desenvolver resistência aos peptídeos, devido a sua inespecificidade do mecanismo de ação, porém isso também é uma desvantagem, por ser um dos possíveis efeitos colaterais pela toxicidade evidenciada em células mamíferas (Hancock; Sahl, 2006).

A maioria destes peptídeos atuam na membrana. Quando ancoram nas células alteram o potencial de membrana, permeabilizam e desregulam o balanço osmótico com a consequente ativação de vias de morte celular tendo como resultado final a lise celular (Mahlapuu *et al.*, 2016). Entre os peptídeos mais conhecidos que apresentaram atividade lítica contra *T. cruzi* podemos mencionar, o peptídeo Melittin do mel de abelha (Adade *et al.*, 2013), Temporin e derivados procedentes da pele de rã (Raja *et al.*, 2017), Batroxicidin isolado de *Bothrops atrox* (Mello *et al.*, 2017), cecropin isolado de *Hyalophora cecropia* e apiedacin (Fieck *et al.* 2010). Nenhum peptídeo foi aprovado para ensaios clínicos, e existem alguns desafios para serem efetivamente utilizados como drogas, como sequências longas demais para serem sintetizadas a baixo custo, a baixa estabilidade em diferentes condições de pH e sal, e a possibilidade de serem hidrolisados por proteases, incluindo também a toxicidade reportada em células mamíferas.

2.4.4. OUTROS PEPTÍDEOS PROMISSORES. A TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY FOI UTILIZADA NO ESTUDO DAS TRANSIALIDASES.

Em 2010, o grupo de Tonelli e cols., tentaram identificar ligantes capazes de interagir com as transialidases (gp85/TS – TS do grupo II). Análises *in silico* das sequências proteicas permitiram a identificação de importantes domínios peptídicos como o domínio FLY e o peptídeo TS9. A fim de identificar

sítios de interação com esses peptídeos, sequências que codificam esses peptídeos foram fusionadas a genes que codificam proteína do capsídeo de fagos filamentosos. Uma vez obtido esses fagos, o bacteriófago contendo o domínio FLY foi injetado em camundongos, e posteriormente avaliado para eficiência de recuperação em diferentes tecidos/órgãos. Este fago foi recuperado de forma eficiente em órgãos os quais normalmente desenvolvem complicações com a infecção crônica do parasito como coração, esôfago e bexiga, porém não foi observado no colón, órgão afetado em alguns pacientes. Neste trabalho, os autores também identificam filamentos intermediários (CK-8, CK-20 e vimentina) como possíveis ligantes (Tonelli *et al.* 2010, 2011). Já para o peptídeo TS9 foi identificado como um ligante de citoqueratinas, e aparentemente forma um sítio de ligação como o peptídeo FLY numa região conservada da proteína. Ensaio com o peptídeo sintético demonstraram que este era capaz de competir com o parasito na ligação reduzindo em 79% o número de células infectadas em relação ao controle (Teixeira *et al.* 2015). Posteriormente, também foi demonstrado que o receptor prokinectin-2 é um provável receptor de gp85/TS dos tripomastigotas, e que o peptídeo sintético GGIALAG derivado de sua cadeia era capaz de interferir com a infecção de células em 42% (Khusal *et al.* 2015).

Estes dados com peptídeos reforçam que moléculas ainda menores que os anticorpos convencionais ou recombinantes podem ter uma melhor aplicabilidade em novas estratégias terapêuticas ainda pouco exploradas.

2.4.5 PARATRANSGÊNESE: UMA PROPOSTA DE CONTROLE DA TRANSMISSÃO DE ORGANISMOS PATOGÊNICOS

O controle paratransgênico é definido como uma metodologia que envolve a manipulação genética de organismos simbioses do inseto vetor, visando diminuir a competência do vetor sem interferir na fisiologia dele. Esses organismos modificados produzem moléculas para atingir o organismo patogênico, interrompendo seu desenvolvimento no hospedeiro, ou por inibir a interação do parasito e o vetor, bloqueando a transmissão, (Hurwitz *et al.*, 2011). No caso de vetores de tripanosomatídeos cujos organismos simbioses já foram modificados geneticamente com sucesso podemos mencionar a

bactéria *Rhodococcus rhodnii* simbiote de *Rhodnius prolixus* (*T. cruzi*) (Beard *et al.* 2002). a bactéria *Sodalis glossinidius* simbiote da mosca tsé-tsé (*T. brucei*) e o *Bacillus subtilis* simbiotes de *Phlebotomus argentipes* (*Leishmania*) (De Vooght *et al.*, 2012 e Ogaugwu; Durvasula 2017)

A bactéria *Sodalis glossinidius* simbiote da mosca Tse-tse foi modificada geneticamente para expressar o *nanobody* não lítico Nb_An33 (De Vooght *et al.*, 2012). A molécula foi conjugada com um sinal de endereçamento (*pelB*) para o espaço periplásmico para facilitar a excreção. A expressão da molécula *pelBNb_AN33* não afetou o crescimento da bactéria quando comparada com a bactéria sem modificar. Posteriormente, (De Vooght *et al.*, 2014) avaliaram a persistência da bactéria recombinante, secreção dos *nanobodies* e a transferência de *S. glossinidius* geneticamente modificado a partir de mosca tsé-tsé para a descendência. Neste trabalho, foi mostrado que o *nanobody* é secretado em diferentes tecidos incluindo o intestino médio. Apesar desses avanços, pesquisas adicionais para elucidar a eficácia da abordagem em condições de laboratório e a liberação de simbiote recombinante nos campos precisam ser conduzidas, contudo os resultados obtidos são bastante promissores.

R. rodnei foi modificado geneticamente para expressar o peptídeo cecropin, um peptídeo bem conhecido que perturba a membrana de *T. cruzi*. A estratégia diminuiu o número de tripomastigotas em condições de laboratório. A expressão do peptídeo cecropin recombinante foi estável mesmo sem a pressão do antibiótico (Durvasula *et al.* 1997). Por outro lado, o geneticamente modificado *R. rhodnii*, que expressa a enzima β -1,3-glucanases de *Arthrobacter luteus* demonstrou ser eficaz para a lise das culturas de *T. cruzi* devido à hidrólise de hidratos de carbono na superfície do parasita, porém nesse trabalho não se incluiu testes *in vivo* dessa abordagem (Jose *et al.* 2013).

Há vários desafios para efetivamente utilizar a abordagem paratransgênica. Entre os requisitos para melhorar o controle paratransgênico, é preciso de uma bactéria com uma via secretora bem caracterizada. A bactéria deve ser capaz de ser transformada com DNA contendo genes de outras espécies (incorporação de DNA), sem que sua proliferação e sua taxa de crescimento sejam afetadas. Além disso, precisa ser isolada e cultivável em

condições laboratoriais. Finalmente, a molécula segregada não deve ser prejudicial ao vetor, nem o simbionte transgênico, pode afetar a microbiota do inseto, estratégias conjugando moléculas líticas com peptídeos específicos para o parasito poderiam melhorar esta estratégia. (Hurwitz *et al.*, 2011b; Mousavizadeh *et al.*, 2017; Wang; Jacobs-Lorena, 2013)

Uma compilação dessas abordagens alternativas pode ser vista no esquema da figura 3.

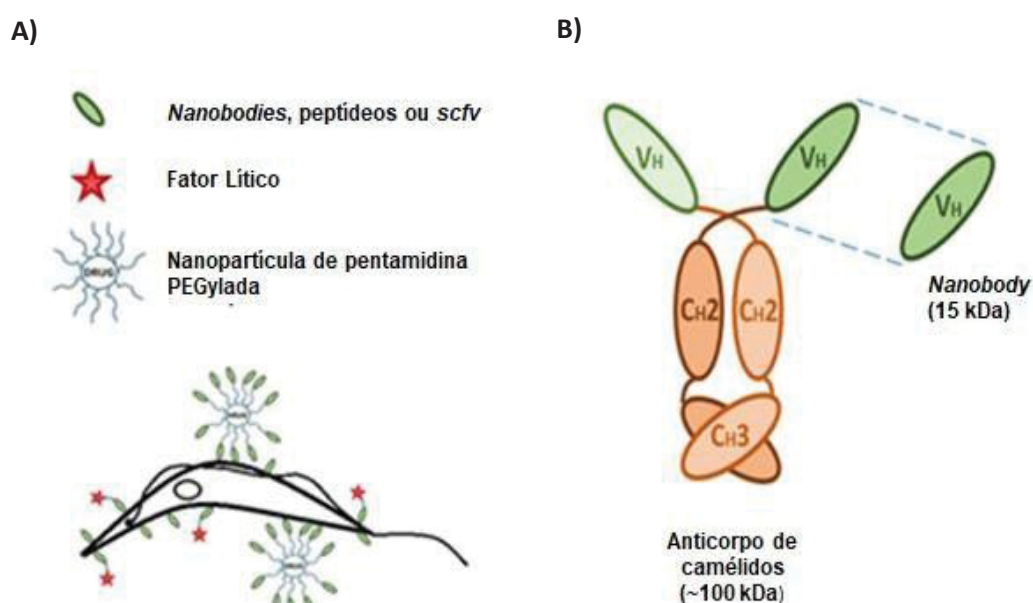


Figura 3. Representação esquemática das estratégias desenvolvidas para atingir tripanosomatídeos

FONTE: adaptado de DAROCHA (2016)

NOTA: A. O esquema mostra as diferentes estratégias desenvolvidas para atingir tripanosomatídeos, Peptídeos, *scfv* e *nanobodies* podem ser usados como moléculas individuais com potencial lítico ou inibidor, também o esquema mostra a possibilidade de conjugar as moléculas ligantes para contornar resistências a drogas ou para a entrega intracelular de drogas anti-tripanosomatídeos. B. Estrutura de um anticorpo de camélidos, a diferença dos anticorpos humanos é a carência de cadeia leve, a região hipervariável é situada na cadeia pesada. Isso permite por técnicas de engenharia genética amplificar uma molécula com peso aproximado de 15 kDa conservando a capacidade de ligação do anticorpo completo.

3. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é um problema de saúde pública em vários países da América Latina, sendo responsável por importante perda produtiva, associada ao desenvolvimento tardio dos sintomas. Dos 10 milhões de pacientes infectados com o parasito, cerca de 30% desenvolverá complicações tardias como insuficiência cardíaca. Esses pacientes precisarão de assistência como cirurgias, marca-passo cardíacos, serviços especializados e estarão inabilitados para trabalhar, diminuindo a capacidade produtiva dos países endêmicos. Embora a doença esteja atualmente espalhada e afetando a países no mundo inteiro até aqueles sem a presença do inseto vetor, a atenção das autoridades sanitárias a nível mundial para realizar medidas de controle eficazes tem sido limitada, focada nas melhorias das moradias, uso de inseticidas e medidas de triagem de pacientes doadores de sangue e órgãos em países endêmicos.

Há mais de 20 anos existem somente duas drogas benznidazol e nifurtimox, com eficácia questionável dependendo do estágio clínico do paciente. E as drogas apresentam efeitos adversos e um alto custo. A desvantagem mais importante é que as drogas demonstraram ineficácia durante a fase crônica da doença, e em recentes estudos clínicos mostraram que quando as complicações já estavam estabelecidas o tratamento não melhorava a qualidade de vida do paciente. Por tanto esforços por encontrar novas drogas ou estratégias para melhorar os parâmetros das drogas atuais são necessários (Morillo *et al.*, 2015). Neste projeto propomos a utilização da estratégia de *phage display* visando encontrar peptídeos que ligam na superfície de formas epimastigotes. Cabe destacar que a ferramenta de *phage display* tem sido útil para identificar receptores e ligantes, além disso as estratégias de controle da transmissão baseada em paratransgênese já testadas experimentalmente carecem de especificidade para o alvo. Sendo assim a descoberta de peptídeos ligantes permitiriam melhorar as técnicas disponíveis para reduzir a transmissão vetorial. Uma vez que essa técnica seja aplicada com eficiência para epimastigotas, nosso grupo de pesquisa pretende estender tal tecnologia para formas presentes no hospedeiro mamífero.

4. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a capacidade de ligação de peptídeos á superfície de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizando a tecnologia de *Phage display*.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar clones de fagos ligantes a superfície de *Trypanosoma cruzi* utilizando as bibliotecas de bacteriófagos L_{X8CX8} e L_{X15};
- Sequenciar e analisar *in silico* as sequências de DNA que codificam os peptídeos apresentados por bacteriófagos que se ligam à superfície de *T. cruzi*;
- Comprovar a capacidade de ligação dos peptídeos identificados por meio de diferentes metodologias;
- Avaliar a capacidade de ligação dos peptídeos a superfície de diferentes formas e cepas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTIVO

Tabela 2. Meios de cultura utilizados para os diferentes organismos que foram cultivados durante a realização deste trabalho.

MEIO DE CULTIVO	COMPOSIÇÃO	ORGANISMO CULTIVADO
LA- Luria Bertani- Agar	Tryptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, e 15 g/L de ágar.	<i>E. coli</i>
LB- Luria Bertani	Peptone 10% m/v, NaCl 10% m/v, extrato de levedura 5% m/v.	<i>E. coli</i>
LIT completo	Infuso de fígado 0.5%; NaCl 75,3 mM; KCL 5,4 mM; glicose 10 mM; bactotriptose 0,5%; Na ₂ HPO ₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%; extrato de levedura 15 g/L, 1% de solução com Penicilina 10000 UI, e estreptomicina 10000 ug (PenStrep-Sigma) além de 10% de SFB (Cultilab) inativado.	<i>T. cruzi</i>
TAU	190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , e 8 mM buffer fosfato, pH 6.0).	<i>T. cruzi</i>
TAU3AA G	Meio TAU suplementado com 10 mM de L-prolina, 50 mM L-sódio glutamato, 2 mM L-sódio aparato, and 10 mM D-glicose).	<i>T. cruzi</i>

Tabela 3. Reagentes utilizados neste trabalho.

REAGENTE	COMPOSIÇÃO
PBS 10X	NaCl 1,37 M; KCL 27 mM; Na ₂ HPO ₄ 100 mM e KH ₂ PO ₄ 18 Mm; pH 7,4.
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5.
Solução de bloqueio de <i>biopanning</i>	TBS e BSA (5 mg/ml).
Solução de lavagem de <i>biopanning</i>	TBS + Tween (0.05%-0.1%).
Solução de eluição de <i>biopanning</i>	Glicina 0,1 M e BSA (1mg/ml), pH 2.
Solução de neutralização de <i>biopanning</i>	Tris-HCl 0,1 M, pH 9.

Solução de bloqueio para ELISA	TBS + Caseína 2%.
Solução de bloqueio para citometria	PBS + BSA (5 mg/ml).
Tampões para transferência de <i>Western blot</i>	ÂNODO 1: Tris-base 300 mM, pH 10; metanol 20%. ÂNODO 2: Tris-base 25 mM, pH 10; metanol 20%. CÂTODO 1: Tris-base 25 mM, pH 10; ácido capróico, 40 mM e Metanol 20%.
Tampão para electroforese SDS-PAGE	Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%.

5.2 CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizados neste trabalho parasitos da espécie *Trypanosoma cruzi* pertencentes às seguintes linhagens: clones Dm28 e cepas G e Y. Formas epimastigotas desses parasitos foram mantidas em fase logarítmica de crescimento em meio LIT completo a temperatura de 28 °C (Contreras *et al.*, 1988).

Para obtenção de tripomastigotas metacíclicos utilizou-se o protocolo previamente reportado por (Contreras *et al.*, 1985), os parasitos foram cultivados até atingir uma densidade de 5×10^7 parasitos por ml, logo coletados e centrifugados a 3000 g e 20 °C por 10 minutos, o *pellet* foi incubado com meio TAU a 28 °C por duas horas, para finalmente ser diluídas a 5×10^6 parasitos por ml em meio TAU3AAG. Após 3 a 7 dias dependendo da cepa os parasitos foram purificados utilizando coluna de DEAE-Celulose. (SIGMA).

5.3 BACTÉRIAS

Neste trabalho foram utilizadas três cepas de bactérias, a bactéria *E. coli* K91 a qual é pili F+, células *E. coli* DH10B para transformações de DNA e as células *E. coli* BL21 (DE3) para expressão de proteínas. As bactérias foram armazenadas a -20°C em solução contendo 50% de glicerol e 50% de meio LB.

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura líquida (LB) ou meio sólido (LA).

5.4 BIOPANNING

A biblioteca de peptídeos L_{X8CX8} e L_{X15} foi originalmente construída por (Bonnycastle *et al.*, 1996). Amavelmente cedida pela professora Juliana Ferreira de Moura (Departamento de Microbiologia, parasitologia e patologia). Para realizar o *biopanning* com células inteiras, adaptamos o protocolo de (Barry *et al.*, 1996). 1×10^7 parasitos epimastigotas vivos do clone Dm28c em fase exponencial foram incubados durante uma hora em meio LIT sem SFB. Os parasitos foram centrifugados a 5000 x g por 5 minutos e lavados duas vezes com solução TBS, após incubados com solução de bloqueio por 1 hora a 4 °C. Depois do bloqueio foram expostas à uma quantidade de 1×10^{12} *transducing units* (TU) de cada biblioteca durante uma hora a 4 °C. Logo as células foram lavadas entre 7-10 vezes com solução de lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em 1 ml de bactéria *E. coli* K91 previamente crescida, incubou-se 15 min e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para titular. Os bacteriófagos foram amplificados e utilizados na mesma quantidade (1×10^{12} TU), para os seguintes *biopanning*, 4 *biopanning* foram feitos, para o último *biopanning* aumentou-se a concentração do Tween (0.1%) na solução de lavagem e utilizou-se a cepa Y, a qual pertence a uma outra DTU (Tcll), que está relacionada com o ciclo selvático da doença.

No caso da biblioteca L_{X15} realizou-se além da eluição com bactéria (incubação com *E. coli* K91, a qual é infectada pelos bacteriófagos que ficaram retidos no *pellet*), a eluição ácida (incubação do *pellet* com soluções com pH entre 2-3), seguindo o procedimento descrito para *biopanning* com a biblioteca L_{X8CX8}, com a diferença que na última lavagem o *pellet* é incubado com 150 µL de solução de eluição por 5 minutos a RT, passado o tempo, se colocou solução de neutralização, centrifugaram-se as amostras, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para amplificar os bacteriófagos ligantes.

5.5 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE BACTERIÓFAGOS L_{X15} E L_{X8CX8} E CLONES ISOLADOS DOS BIOPANNING.

Um volume de 1 ml de bactéria *E. coli K91*, preparada previamente foi incubada com o *pellet* de células durante 15 minutos a RT sem agitação e posteriormente, a mistura se adicionou 100 ml de meio LB contendo 0.2 µg/ml de tetraciclina. Após 30 minutos de indução a 200 rpm, ajustou-se a concentração de tetraciclina para 20 µg/ml. As bactérias foram incubadas durante 16 h á 37 °C e sob agitação de 200 rpm.

Para amplificação dos bacteriófagos das bibliotecas o volume usado de meio LB foi de 500 ml, e 5×10^{10} TU foram utilizados para infectar um volume de 100 ml de bactéria previamente crescidas.

A cultura de bactérias com os bacteriófagos amplificados foi dividida em tubos falcon estéreis de 50 ml e centrifugada a 4° C a 2500 x g durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, onde adicionou-se 20% de PEG 8000. O conteúdo foi misturado aproximadamente 100 vezes por inversão e precipitado por 16-20 horas a 4 °C. No dia seguinte a solução contendo os fagos em precipitação foi centrifugada a 6080 x g por 40 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em TBS e incubado novamente com PEG 8000 durante 4-5 horas a 4 °C, por último a solução foi dividida em microtubos de 1,5 ml e centrifugada a 8000 x g por 40 min a 4 °C, eliminou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de TBS, para eliminar debris celulares centrifugou-se 8000 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi guardado a -20 °C até o uso.

Para a titulação das bibliotecas amplificadas, uma colônia de *E. coli K91* foi crescida num pre-inóculo de 5 ml colocado o dia anterior à titulação, o dia seguinte foi colocado 2 ml do pre-inóculo em 100 ml de meio LB sem antibiótico, a cultura incubou-se a 37 °C e 200 rpm por aproximadamente 4 horas até atingir uma densidade óptica de 1,8, logo a célula foi incubada a 50 rpm e 37 °C para a expressão do pilus F, posteriormente 10 µL de cada uma das diluições de bacteriófagos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-8}) foram incubados com 200 µL de cultura *E. coli K91* e incubadas a RT por 15 minutos, após a incubação os 200 µL, das bactérias infectadas foram plaqueadas em placas com meio LB suplementado com Agar e tetraciclina a 20 ug/ml. O dia seguinte contou-se as colônias e com a seguinte formula calculou-se o TU/ml:

TU/ml= (Número de colônias por placa x diluição do estoque original x 100).

A titulação dos *biopanning* foi semelhante, porém os pellets incubados com células *E. coli* K91 foram diretamente utilizados para a titulação, 10 µL das bactérias infectadas foram diluídas a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} e plaqueadas em placas com meio LB suplementado com Agar e tetraciclina a 20 ug/ml. O cálculo de TU/ml foi igual.

5.6 AMPLIFICAÇÕES DO DNA DE BACTERIÓFAGOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES AMPLIFICADOS

Das colônias de bactérias do último *biopanning*, 21 colônias da biblioteca L_{X8CX8} foram aleatoriamente escolhidas, e no caso da biblioteca L_{X15} foram 30 colônias.

O DNA foi amplificado com a técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*), numa reação de 30 µL de volume, colocou-se 2 UI de *Pfu* polimerase, 1x de Tampão de reação de PCR (NEB), 1.5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0.2 µM de cada iniciador, uma colônia é fornecida a cada reação, e o volumem é completado com agua mili Q.

A reação ocorreu num termociclador *Applied Biosystem 2720 Thermo cycler*, com o seguinte protocolo de amplificação, desnaturação inicial 95 °C por 5 minutos, 95 °C desnaturação em cada ciclo por 1 minuto, 57 °C e 30 segundos de alinhamento, 72 °C e 30 segundos de extensão. Para um total de 35 ciclos, dois pares de iniciadores foram fornecidos, o F88.4_1_For 5'-CCTTTAATCGGCCTCCTGTT-3' e Claude_Rev 5'-TCGGCAAGCTCTTTTAGG-3'. Algumas reações tiveram baixo rendimento, para aumentar a quantidade de DNA para o sequenciamento, as reações foram amplificadas novamente com as mesmas condições com a diferença do ciclo de desnaturação que foi de 95 °C com 30 segundos de duração.

O sequenciamento dos produtos de amplificação foi feito pela técnica de Sanger. O sequenciamento da biblioteca L_{X8CX8} foi realizado amavelmente pela unidade de sequenciamento do Instituto de ciências biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e as colônias da biblioteca L_{X15}

foram sequenciadas na empresa WIMSEQ. Para o sequenciamento o iniciador F88. 4_1_. For 5'-CCTTTAATCGGCCTCCTGTT-3' foi utilizado.

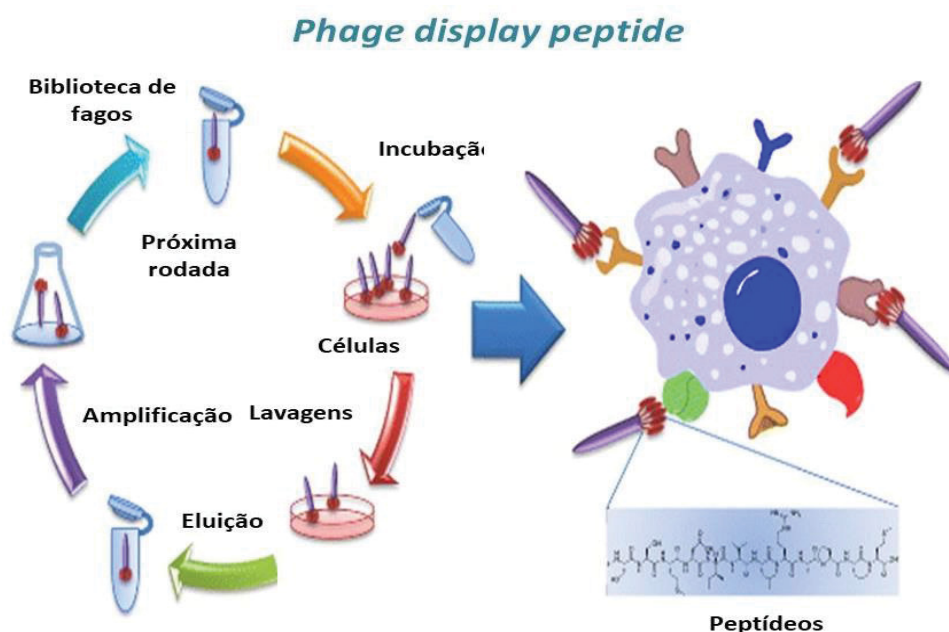


Figura 4. Representação esquemática da estratégia de *biopanning*.

FONTE: Adaptado de (Wu *et al.*, 2016)

Nota: Esquema que mostra os passos para realizar o *biopanning* com células inteiras, bibliotecas contendo peptídeos randômicos são construídas fusionando oligonucleotídeos randômicos (NNK) com o genoma de bacteriófagos filamentosos (fd, M13), os quais são inseridos em regiões codificantes para proteínas de cápside, sendo expressos com a proteína e expostos na superfície viral (pVIII ou pIII), essa bibliotecas são incubadas com o alvo, sendo que posterior a várias lavagens os bacteriófagos são eluídos, amplificados e utilizados para próximas rodadas, finalmente aqueles bacteriófagos que ficam retidos nas últimas etapas são sequenciados para conhecer os peptídeos com potencialidade para serem ligantes.

5.7 ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.

As sequencias obtidas foram analisadas com o programa *Bioedit* versão 4.0.6 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). As sequências foram traduzidas para os respectivos peptídeos utilizando a ferramenta online *Expassy translate tool* (<http://web.expasy.org/translate>). As sequências de peptídeos foram comparadas com base de dados de proteínas através da ferramenta *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos foram feitos na ferramenta *CLUSTAL OMEGA* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), e as estruturas tridimensionais das proteínas foram preditas através da ferramenta *Phyre 2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) e visualizadas com

a aplicação *Expassy Swiss PDB viewer* disponível no site (<https://spdbv.vital-it.ch/>).

5.8 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO CLONE EPI18 IDENTIFICADO NO SEQUENCIAMENTO

O clone EPI18 identificado no sequenciamento da biblioteca L_{X8CX8} e o bacteriófago fd-tet (bacteriófago sem gene para a proteína recombinante), foram amplificados segundo o procedimento 5.5. Para o ensaio de ligação 1×10^7 parasitos das cepas Y, G e o clone Dm28 foram incubados com solução de bloqueio e depois expostos a 1×10^{10} TU de EPI18 ou fd-tet. Após a incubação, os parasitos foram lavados 7-10 vezes com solução de lavagem e o *pellet* utilizou-se para titulação.

5.9 ELISA COM CÉLULAS FIXADAS DE *T. CRUZI* E *LEISHMANIA MAJOR* PARA AVALIAR LIGAÇÃO DO CLONE EPI18 E PEPTÍDEO SINTÉTICO EPI18.

Para avaliar a ligação do clone EPI18 utilizou-se uma reação de ELISA, uma placa de fundo redondo foi inoculada com 1×10^6 parasitos das cepas Y, G e o clone Dm28 de *T. cruzi* em cada poço. Os parasitos foram fixados com paraformaldeído 4% por 1 hora a 4 °C, seguido de centrifugação em cada lavagem a 1500 x g por 2 minutos e retirado o sobrenadante, lavada duas vezes com TBS, e incubada com solução de bloqueio para ELISA, a 37 °C por 1 hora. Uma diluição contendo 1×10^{10} TU de bacteriófagos foste colocada em cada poço e incubada a 37 °C por 1 hora.

A placa foi centrifugada novamente, descartou-se o sobrenadante e uma diluição de 1:2000 de anticorpo Anti-M13 (SIGMA) foi colocada em cada poço e incubada novamente nas mesmas condições. A placa foi lavada e incubada com tampão de revelação (citrato trissódico 0,04 mol/l, ácido cítrico 0,01 mol/l e H₂O₂ 0,33% (v/v)) e 0,2 mg/ml de OPD. A reação ocorreu por 15 minutos e logo a reação se deteve com 20 µL de H₂SO₄ diluído a 5%. A placa foi lida num leitor de placa i-Mark da Bio-Rad a 495 nm.

Os ensaios com peptídeos foram feitos com a mesma metodologia que com a ELISA de bacteriófagos, porém com algumas diferenças. Um estoque de 1 mg de peptídeo sintético EPI18 e um peptídeo não relacionado nomeado como UP, foi previamente biotinilado usando o kit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin kit (Thermo-Fisher). Os peptídeos foram colocados de acordo a uma anterior distribuição dos poços, em concentrações na faixa de 0.25 até 5 μ M, a reação incubou-se com as células por uma hora a 37 °C e depois de 3 lavagens com TBS a reação incubou-se com uma diluição de estreptavidina conjugada a peroxidasse 1:10000. A placa foi incubada uma hora a 37 °C e lida como descrito anteriormente. Neste ensaio foi incluída a espécie *Leishmania major* para avaliação da ligação do peptídeo na mesma densidade de célula 1×10^6 .

5.10 CITOMETRIA DE FLUXO

Parasitas da cepa Y, foram utilizados em ensaios de ligação e analisados por citometria de fluxo. Aproximadamente 1×10^7 epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicos foram centrifugados a 3000 x g por 5 minutos, lavados 3 vezes com PBS 1X, e incubados com solução de bloqueio para citometria, por 1 hora a 4 °C. Posteriormente incubados com 50 μ M de peptídeo EPI18 ou UP por 1 hora a 4 °C, lavados duas vezes com PBS 1X e fixados com paraformaldeído 4% por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação foram lavados duas vezes com PBS 1X e incubados com uma diluição de estreptavidina conjugada com Alexa 546 numa diluição de 1:50, durante 16 horas a 4 °C, por último os parasitos foram lavados novamente com PBS 1x e o *pellet* ressuspenso em PBS 1X filtrado. A análise foi feita no citometro de fluxo BD Accuracy C5, usando o filtro FL1 (530/30 nm), que capta a fluorescência verde, emitida em 509 nm. Como controle inclui-se um parasito incubado só com a proteína conjugada com o fluoróforo, controle nomeado como WT-FITC, considerando-o linha de base para a fluorescência, para o posterior cálculo das células fluorescentes.

5.11 MICROSCOPIA CONFOCAL

Parasitos da cepa Y e G foram preparados para realizar análises de fluorescência por microscopia confocal, 1×10^7 parasitos foram coletados e incubados com solução de bloqueio para citometria e logo com 50 μ M de peptídeo EPI18 ou UP por 1 hora a 4 °C, lavados 3 vezes com PBS e fixados com PF 4% por 5 minutos, A incubação com estreptavidina conjugada com ALEXA 546, ocorreu durante 16 h a 4 °C, após a incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS-1X e o núcleo marcado com 0.1 μ g/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, (DAPI, Sigma) a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se a 3000 x g por 5 minutos. Cada sobrenadante foi descartado e os *pellet* ressuspensos em cerca de 20 μ l de meio de montagem aquoso Fluoromont™ F4680 (Sigma). Para montagem de cada lâmina foram pipetados 2 μ L da amostra sobre lâmina de vidro e em seguida cobertas com a lamínula.

As imagens foram obtidas no microscópio multifotón modelo A1 MP+, marca Nikon em objetiva de 60. Para visualização foram utilizados os filtros FITC (excitação em 488 nm e emissão em 515 a 55 nm) e DAPI (excitação em 325 a 375 nm e emissão em 435 a 485 nm).

5.12 IC 50 DO PEPTÍDEO EPI18

Parasitos da Cepa Y foram utilizados para avaliar atividade lítica do peptídeo EPI18. 1×10^6 parasitos foram colocados em cada poço de uma placa de cultura celular, em 1 ml de meio LIT e com concentrações de peptídeo sintético EPI18 entre 5 μ M até 200 μ M. No caso do controle colocou-se PBS (100 μ L), as reações ocorreram por 72 horas.

5.13 CONJUGAÇÃO DA SEQUÊNCIA EPI18 COM A PROTEÍNA GST

O peptídeo EPI18 foi conjugado com a proteína solúvel GST. Para isso o plasmídeo pGEX-4T1 foi digerido com as enzimas BamHI e XhoI durante 16 horas a 37 °C. O plasmídeo digerido foi submetido a separação em gel de

agarose 1% e purificado com o “*GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” seguindo as indicações do fabricante.

Dois iniciadores que correspondem com a sequência do peptídeo EPI18, foram nomeados como EPI18_PLUS e EPI18_MINUS e alinhados numa relação molar 1:1 (10 µM). Os iniciadores foram diluídos em tampão Yellow Tango 1X (Thermo Fisher) para um volume de 50 µl. A reação foi incubada a 95 °C por 5 minutos, e esfriada a 25 °C por 45 minutos, e diluída 1:5. Estoques da diluição foram armazenados a -20 °C.

Uma reação de ligação foi feita com aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial previamente purificado, com 2 µl da diluição de oligonucleotídeos. A ligação ocorreu a 16 °C por 16 horas, seguido de aquecimento a 70 °C por 5 minutos, para inativar a T4 DNA ligase. 2 µL da reação foram usadas para transformar células electrocompetentes de *E. coli DH10B*.

5.13.1 CONFIRMAÇÃO DAS PROTEÍNAS CONJUGADAS GST COM SEQUÊNCIAS EM TANDEM DO CLONE EPI18.

Colônias isoladas de *E. coli DH10B* previamente transformadas com a ligação foram crescidas para extração de DNA plasmidial. Esse DNA foi utilizado como molde para confirmar a ligação em uma reação em cadeia da polimerase, utilizando os iniciadores GST 5' (5'-AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA C-3') e GST 3' (5'-ACC CGC CAA CAC CCG TGA CGC-3') que amplificam um fragmento da sequência correspondente a GST (322 pb). O tamanho do fragmento muda com a presença do peptídeo (377 pb). A reação foi feita com as seguintes condições, 95 °C e 30 segundos, 60 °C e 30 segundos, 72 °C e 30 segundos, com 35 ciclos em total.

5.14 ENSAIOS DE LIGAÇÃO COM A PROTEÍNA GST E GST-1X::EPI18

Para esse experimento foram utilizados 1×10^7 parasitos da cepa Y, que foram incubadas em meio sem soro por uma hora, depois lavadas 2-3 vezes com meio TBS, e incubadas em solução de bloqueio. Posteriormente os parasitos foram expostos a concentrações de 4 µM da proteína GST e 3.7 µM da proteína GST-1XEPI18. Os parasitos foram incubados a 4 °C por 1 hora e

posteriormente lavados 7-10 vezes com solução de lavagem. O *pellet* da última lavagem foi ressuspenso em 50 µL de tampão da amostra.

5.15 SDS-PAGE DO EXTRATO PROTEICO TOTAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

10 µL de cada amostra ($0,2 \times 10^7$) foram submetidos a separação electroforética em gel de SDS-PAGE 12 %. A corrida foi realizada em tampão para SDS-PAGE a 120 volts por 1 hora e 30 minutos. Os géis foram corados pela imersão em solução de Azul de coomassie por cerca de 3 horas e depois descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético.

5.16 WESTERN BLOT DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Após separação eletroforética de proteínas em gel de SDS-PAGE foi montado um sistema para transferência úmida de proteínas, que consiste em cerca de 3 folhas de papel filtro embebidas na solução de transferência ânodo 1, outras 3 folhas embebidas na solução ânodo 2, uma membrana de nitrocelulose *Hybond* (Amersham) umedecida com solução ânodo 2, assim como o gel de poliacrilamida que também foi umedecido nessa solução, e acima foram colocadas 3 folhas mais embebidas em solução cátodo 1, esse sistema foi montado em um sistema de transferência semi-seca *Trans-Blot SD* (Bio-rad), a transferência ocorreu durante 40 minutos a 10 volts.

Após a transferência a membrana foi corada com *Ponceau S* até que fosse possível a visualização de bandas, depois foi brevemente lavada com água destilada e então incubada com solução de bloqueio para *Western blot*, durante a noite sob agitação constante. No dia seguinte a membrana foi lavada 3 vezes com PBS/T e incubada com o anticorpo primário (anti-GST) proveniente de coelho, na diluição 1:10000 em PBS/T em seguida a membrana foi lavada 3 vezes com PBS/T e incubada 1 hora com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com peroxidase na diluição 1:3000 (em PBS/T). Finalmente foram realizadas 3 lavagens com PBS/T e a membrana foi revelada utilizando o *kit ECLTM Wester blotting systems* (GE HEALTHCARE), por quimiluminescência em filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (GE HEALTHCARE), seguindo as instruções do fabricante.

6. RESULTADOS

6.1 PADRONIZAÇÃO DO BIOPANNING

A fim de obter moléculas ligantes a superfície de *T. cruzi* com potencial de aplicação biotecnológica, nós decidimos implementar a estratégia de *phage display* para identificar peptídeos que interajam com epimastigotas. Optamos por epimastigotas como alvo, visto que os peptídeos ligantes poderão ser aplicados a estratégia de paratransgênese, além da manipulação de epimastigotas ser menos laboriosa. Inicialmente, testamos as condições de ligação de duas bibliotecas expressando peptídeos fusionados com a região N- terminal da proteína VIII do capsídeo. A biblioteca L_{X8CX8} possui clones expressando peptídeos de 17 aminoácidos, sendo que X8CX8 indica que 16 posições correspondem a resíduos de aminoácidos aleatórios separados por uma cisteína na posição 9. Já a segunda biblioteca denominada L_{X15}, os bacteriófagos apresentam um peptídeo de 15 aminoácidos, sendo que toda sequência é variável (Bonnycastle *et al.*, 1996). O protocolo utilizado para pescar os clones expressando peptídeos ligantes foi elaborado baseando-se em experimentos desenvolvidos em células mamíferas (Barry, Dower, e Johnston 1996) com algumas modificações (ver Materiais e Métodos - Item 5.2).

Para encontrar a condição ideal, foram realizados *biopanning* de epimastigotas (vivas ou fixadas) em duas temperaturas (4 e 28°C). As médias de recuperação do primeiro *biopanning* nas diferentes condições de incubação podem ser vistas na figura 5A. Quando comparamos as eficiências de recuperação de bacteriófagos nas condições: parasitos vivos (PV) ou fixados (PF) incubados a 4°C ou 28°C, não detectamos diferenças significativas no primeiro *biopanning*, independente da biblioteca utilizada (L_{X15} ou L_{X8CX8}). Na figura 5A também é possível detectar uma eficiência de recuperação próximo a 10³ TU/mL. Uma vez que não detectamos diferenças nas condições de incubação decidimos seguir os demais *biopannings* com parasitos vivos a 4°C.

Na figura 5B é mostrada as recuperações (TU/mL) utilizando-se o *pool* de fagos obtidos após 3 *biopannings* com epimastigotas do clone Dm28c contra epimastigotas da cepa Y em um 4º *biopanning*. Nesse experimento as médias de recuperação oscilaram de 2×10^6 a 10×10^6 TU/mL não mostrando tendências. Estes dados de recuperação, apontam que apesar de ter sido utilizado como isca parasitos de outra DTU existem clones de fagos que reagem com a superfície de epimastigotas independente da cepa isca.

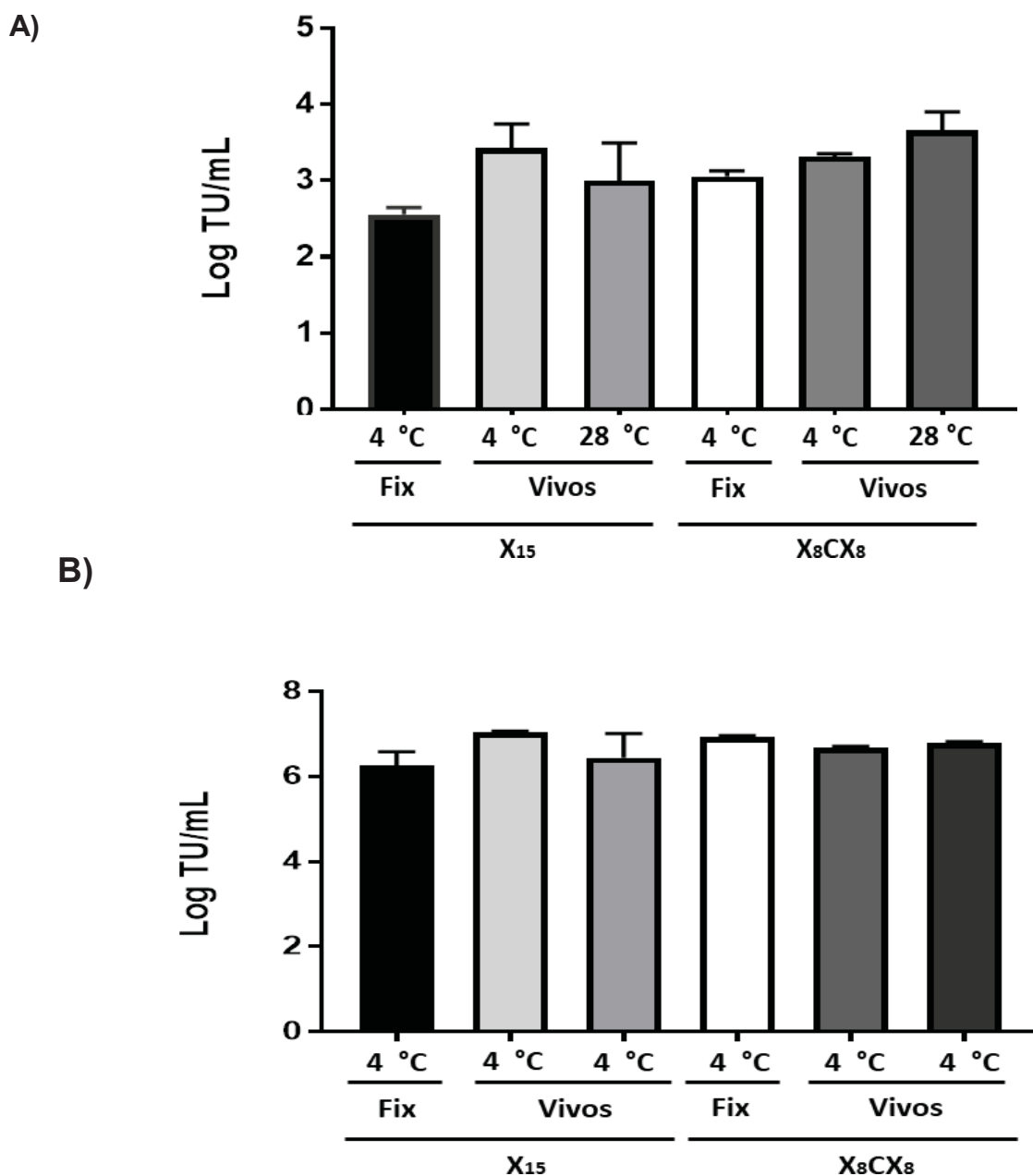


Figura 5 Eficiência de recuperação de bacteriófagos em diferentes condições de *biopanning* com epimastigotas de *T. cruzi*.

Nota: 5A. Temperatura de incubação não afeta de forma significativa a capacidade de ligação da biblioteca de bacteriófagos. Titulação clones obtidos no primeiro biopanning utilizando 1×10^7 epimastigotas do clone Dm28c e 1×10^{12} bacteriófagos. Foram testadas duas condições de temperatura (4°C e 28°C) e o estado do parasito (PV = Parasito Vivo ou PF = Fixado) com as duas bibliotecas LX15 e LX8CX8.4B. Fagos reativos com parasitos do clone Dm28c reagem de forma cruzada com epimastigotas da cepa Y. Pools de fagos obtidos no primeiro biopanning como indicado no painel A e posteriormente em dois panning a 40°C, usando como isca epimastigotas do clone Dm28c foram submetidos a um 4º biopanning a 40°C utilizando epimastigotas da cepa Y. Título de bacteriófagos após incubação de 1×10^{10} TU com 1×10^7 epimastigotas da cepa Y incubadas a 4°C.

6.2 SELEÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS DA BIBLIOTECA L_{X8CX8} REATIVOS COM EPIMASTIGOTAS - *BIOPANNING* L_{X8CX8}

Os parasitos vivos foram incubados com 1×10^{12} TU da biblioteca L_{X8CX8}, como descrito no item 5.4. Na primeira rodada (1º *biopanning*) de incubação mostrou que a recuperação foi de aproximadamente 10^3 TU/mL, 10^9 vezes menos TU que os contidos no inoculo inicial (10^{12}), ficaram retidos no pellet. Como pode observar-se na figura 6, nosso protocolo teve uma dinâmica similar com outros ensaios de *biopanning* previamente testados (Barry *et al.*, 1996 e Watters *et al.*, 1997). No primeiro *biopanning* foi retido uma quantidade baixíssima de clones em relação a quantidade de fagos incubados (1×10^{12} TU), contudo esse rendimento é elevado a cada rodada. Como comentado no item anterior, um total de 4 rodadas de *biopanning* foram feitas, sendo a última realizada com parasitos da cepa Y. O 1º *biopanning* teve um rendimento médio de 1,9-3,5 Log TU/ml ($\sim 2 \times 10^2$ - $3,5 \times 10^3$ TU/mL).

Nota-se que o rendimento aumentou nas rodadas seguintes. Na última etapa obteve-se um rendimento médio de 6,88-7,02 log TU/ml ($\sim 7,5 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^7$ TU/mL), ou seja, cerca de 18000 vezes mais fagos no último *biopanning* comparado com o primeiro. Ainda pode-se ressaltar a não houve grande variação na eficiência de ligação mesmo utilizando cepas distintas.

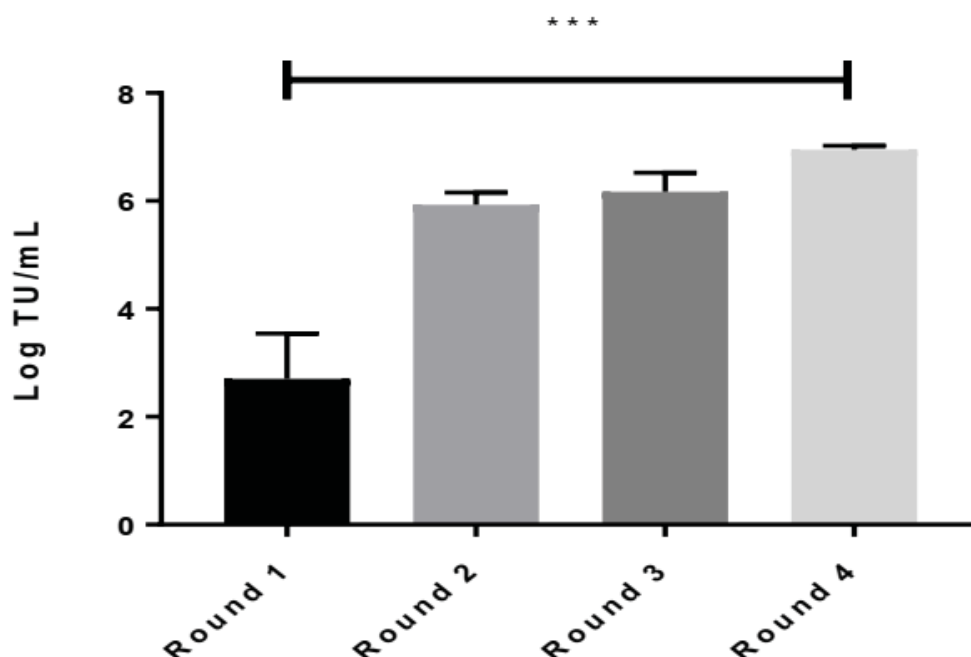


Figura 6. Evolução da eficiência de recuperação de fagos a cada *biopanning* com a biblioteca L_{X8CX8} .

FONTE: O autor

Nota: Cada etapa de *biopanning* foi feito com 1×10^{12} TU e 1×10^7 parasitos. Os bacteriófagos isolados do passo anterior foram utilizados para a seguinte rodada de *biopanning*. Anova One Way, $p=0.014$.

6.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE *IN SILICO* DOS CLONES ISOLADOS.

A fim de identificar os peptídeos codificados pelos fagos que reconhecessem múltiplas cepas de *T. cruzi* resolvemos sequenciar clones obtidos após o 4º *biopanning*. O genoma do bacteriófago utilizado por (Bonnycastle *et al.*, 1996), possui duas cópias do gene para a proteína do capsídeo pVIII, sendo que uma constitui a cópia selvagem e a segunda é expressa fusionada aos peptídeos aleatórios (pVIIIR). Desta forma para sequenciar a cópia recombinante, dois iniciadores que alinham flanqueando de forma específica a sequência de pVIIIR (como pode ser visto na figura 7A) foram utilizados na reação de PCR.

Depois da realização das quatro rodadas de *biopanning* (L_{X8CX8}), escolhemos aleatoriamente 21 colônias da última rodada para amplificar a região de interesse (pVIIIR), pela reação em cadeia da polimerase como descrito no item 5.6. As amplificações foram confirmadas em géis de agarose (Figura 7B), gerando um produto de 750 pb. Esses DNAs obtidos, foram purificados e submetidos ao sequenciamento de Sanger.

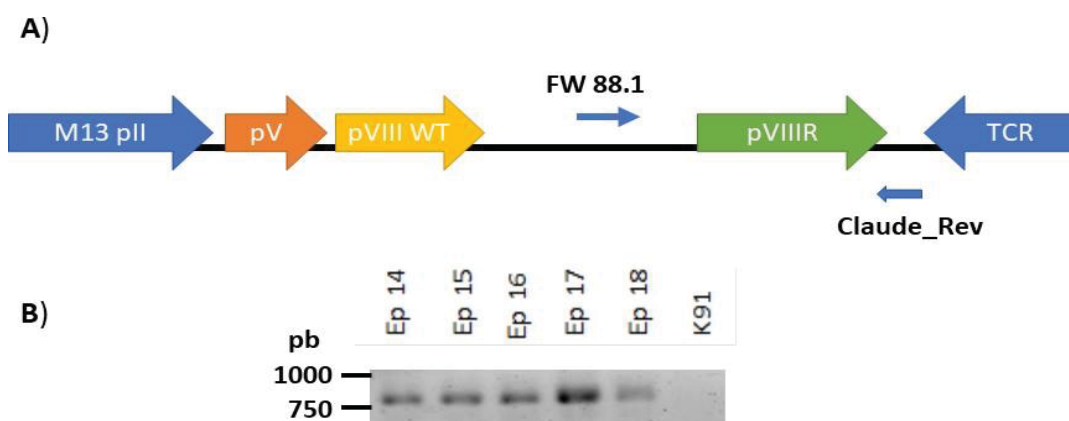


Figura 7. Esquema representando os sítios de alinhamentos dos iniciadores no genoma viral e os produtos de PCR de alguns clones amplificados da última etapa de *biopanning* com a biblioteca L_{X8CX8} .

Fonte: O autor

NOTA: Em A, representação do genoma do bacteriófago, f88.4 destacando as duas cópias dos genes pVIII (Bonnycastle *et al.* 1996). As setas indicadas com FW88.1 e Claude_Rev correspondem aos iniciadores que alinham na cópia do gene recombinante. Em B, produto de PCR de alguns clones amplificados. O controle K91 (*E. coli*) não mostrou amplificação quando não é infectada por bacteriófagos.

Das 21 colônias originais, 10 sequências foram obtidas com sucesso, observou-se um único clone, que codifica para um único peptídeo como pode ser visto na figura 8. O qual a partir de agora será identificado como EPI18. A figura 8 mostra as sequências emascaradas dos 10 clones isolados, alinhadas com a ferramenta CLUSTAL OMEGA. Na mesma figura, podem ser vistos dois clones que apresentam trocas de nucleotídeos, o primeira mostra uma troca de C por T no códon que codifica para o aminoácido cisteína, a qual não muda o aminoácido codificado pelo códon. A outra variação é um T por C no códon que codifica para o aminoácido valina, mudando para um códon que codifica para alanina. Esta troca não afeta à carga e hidrofobicidade do peptídeo, uma vez que são classificados como aminoácidos com grupo R alifático apolares. As sequências foram mascaradas, uma vez que pretendesse patentear o peptídeo, caso seja demonstrado seu potencial biotecnológico.

Fonte: O autor.

Nota: “N” e “X” correspondem aos nucleotídeos e aminoácidos mascarados na região que codifica o peptídeo ligante, respectivamente. Os dados do sequenciamento foram processados utilizando o software *Bioedit* o alinhamento foi feito com a ferramenta *CLUSTAL OMEGA* (1.2.4).

Uma vez que o peptídeo obtido possa constituir um peptídeo mimético, ou seja, que se assemelhe a uma proteína que interaja com a superfície de epimastigotas, foram realizadas pesquisas por homologia em bancos de dados utilizando a ferramenta Blastp. Nessas pesquisas de homologia selecionamos como banco de dados dos organismos pertencentes a família Reduviidae (Reduviidae (taxid:27479)), ou seja, da família dos insetos vetores. Consideramos que os potenciais interatores mimetizados pelo peptídeo EPI18 seriam proteínas de membrana com regiões extracelulares, ou que sejam secretadas no espaço extracelular.

Na tabela 4, são mostradas as proteínas que apresentaram maior grau de identidade/similaridade com a sequência do peptídeo EPI18. Encontramos duas proteínas que formam parte do secretoma dos insetos vetores, e uma proteína que é um fator de transcrição. A proteína pallidipin-like da espécie *Panstrongylus chinai* (Kato *et al.*, 2017) possui uma estrutura terciária que corresponde a um barril de folhas beta, apresenta um domínio pertencente à família lipocalin, presente em outras proteínas do inseto como as nitroforinas e triabin (Noeske-Jungblut *et al.* 1994). A outra proteína reconhecida foi a aspartil protease, uma enzima proteolítica secretada no intestino de *T. infestans* (Balczun *et al.*, 2012). Contudo, embora as proteínas tenham apresentado algum grau de conservação, tiveram baixa cobertura da sequência

comparada e *e-value* alto como era esperado, uma vez que a sequência comparada é muito pequena.

Tabela 4. Identificação de prováveis proteínas envolvidas na interação parasito: hospedeiro invertebrado, comparado o peptídeo EPI18, com base de dados de triatomíneos.

Descrição da sequência encontrada no banco de dados usando a ferramenta BlastP	Cobertura	E-value	Identificador
Pc03, similar to Td42, pallidipin-like [<i>Panstrongylus chinai</i>]	47%	1.2	BBA30613.1
aspartyl protease [<i>Triatoma infestans</i>]	41%	1.2	AAS72876.1
Kruppel-like protein 1 [<i>Rhodnius prolixus</i>]	29%	4.8	AEW22980.1

Apesar desses baixos valores de conservação resolvemos analisar quão exposto na cadeia polipeptídica estão dos resíduos de aminoácidos similares a EPI18. A estrutura terciária foi predita utilizando Phyre 2, a qual utiliza base de dados de proteínas conhecidas para predizer a estrutura das sequências de interesse. O arquivo foi visualizado como indicado no item 5.7, e a estrutura terciária da proteína é apresentada com os sítios de coincidência marcados de cor roxo, como pode ser visto na figura 8.

Na posição superior da figura 9 observa-se a aspartyl protease, uma proteína com um total de 386 aminoácidos, as regiões correspondentes aos resíduos que batem com a sequência do clone EPI18, se encontram em duas regiões, na posição dos aminoácidos 28-32 e a outra porção na posição 173-174. Pallidipin-like, é uma proteína menor, possui 170 aminoácidos em total, sendo que os aminoácidos 1-5 e 61-63 representam os sítios de correspondência. É importante mencionar que os sítios de ambas as proteínas são expostos. Os resíduos encontrados poderiam constituir ligantes presentes no intestino dos insetos, ou seja, estes seriam as reais moléculas interatoras com os epimastigotas que estão sendo mimetizados pelo peptídeo identificado. Como o tamanho das regiões comparadas são pequenas (alto *e-value*) não podemos ter confiança que seja interatores, dados adicionais são necessários para identificá-los.

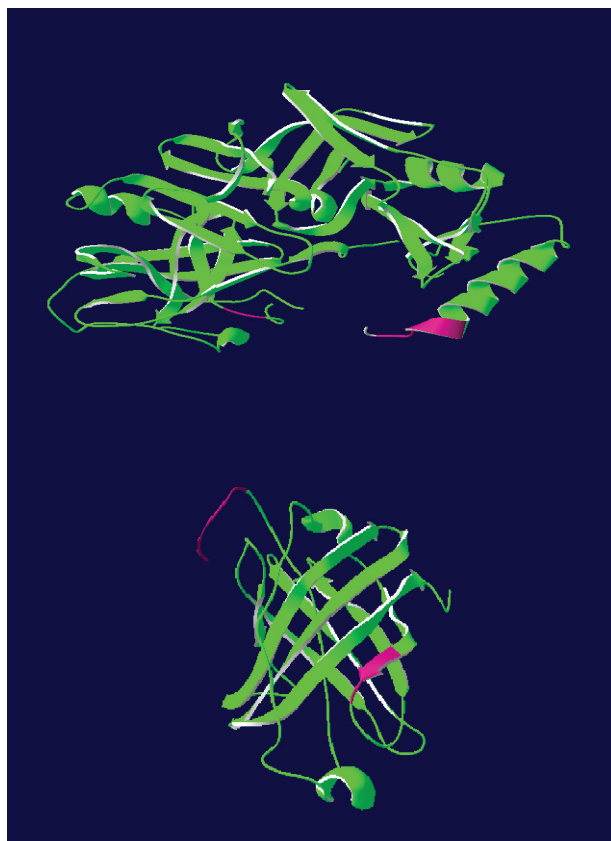


Figura 9. Estrutura terciária predita por Phyre2 das sequências de proteínas retornadas da busca com o algoritmo BLASTp, quando comparadas as bases de dados de triatomíneos com a sequência do clone EPI18.

FONTE: O autor

NOTA: A figura superior é a estrutura terciária da Aspartyl protease de *Triatoma infestans*, a figura inferior à estrutura de pallidipin-like de *Panstrongylus chinai*, as estruturas secundárias estão de cor verde, os resíduos correspondentes à sequência de EPI18 estão marcados de cor vermelho.

6.4 EFICIÊNCIA DA LIGAÇÃO DO CLONE EPI18 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Para comprovar a eficiência de ligação utilizando um único clone isolado dos *biopanning* (L_{X8CX8}), o clone EPI18 foi testado em ensaios de recuperação de bacteriófagos e ELISA, como mostrado a seguir.

O clone EPI18 foi amplificado e titulado, e posteriormente exposto aos parasitos como descrito no item 5.8. Avaliou-se a eficiência de recuperação de fagos pela titulação e comparando com ensaios realizados com bacteriófago fd-tet (bacteriófago que não expressa peptídeo em fusão a pVIII). Após a incubação de 1×10^{10} TU do clone EPI18 ou de fd-tet com os parasitos, foram recuperados mais bacteriófagos nas cepas incubadas com o clone

recombinante (Figura 10). De acordo com a linhagem/cepa de parasito obteve-se as seguintes eficiências médias: cepa Y – 8,67-9,05 Log TU/mL, clone Dm28c – 7,04-7,76 Log TU/mL; e a cepa G – 7,81-7,99 Log TU/mL. Estes dados podem ser vistos na figura 10.

Existe uma diferença dos títulos entre o clone fd-tet e EPI18, para ligar nos epimastigotas. O clone EPI18 foi recuperado aproximadamente 4900 vezes mais que o bacteriófago fd-tet quando testado na cepa Y, a cepa que utilizamos para realizar a última etapa de *biopanning*. No caso do clone Dm28c foi de 1000 vezes maior ao controle, e com a cepa G a recuperação é aproximadamente 6400 vezes maior (Figura 10).

Não se observam diferenças estatísticas entre a cepa Y (TcII) e G (TcI), as duas cepas pertencem a DTU diferentes, a cepa Y está associada com a transmissão doméstica e a cepa G com a transmissão silvestre, (Brenière *et al.*, 2016). Existe uma diferença com o clone Dm28, que não afeta o resultado geral do experimento devido à comprovação que o clone EPI18 liga em DTU diferentes.

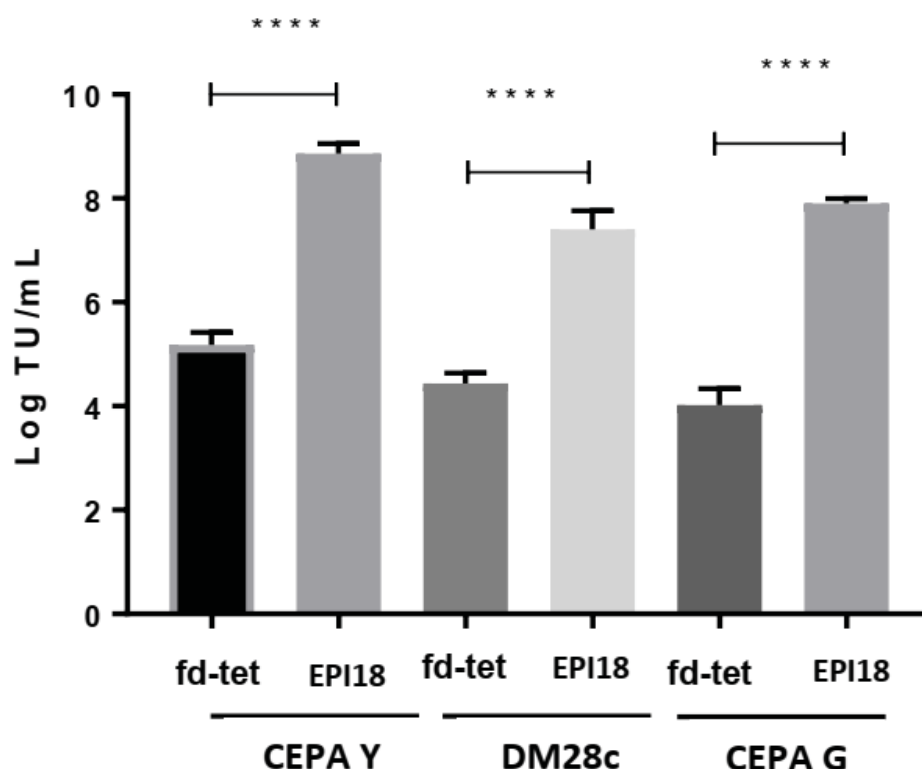


Figura 10. Ensaios de ligação do bacteriófago EPI18 em epimastigotas.

FONTE: O autor.

NOTA: 1×10^7 de células epimastigotas vivas foram incubadas com 1×10^{10} TU do clone EPI18 ou fd-tet. A recuperação de fagos foi calculada como log de TU. Anova One-Way, $p < 0.001$ em todos os tratamentos.

A figura 11 mostra os resultados de incubação do clone EPI18 com tripomastigotas metacíclicos da cepa Y, que apresentou uma diferença estatística observada de 10 vezes em relação ao controle fd-tet. Apesar dessa eficiência de recuperação, este valor é 100 vezes menor quando comparado com a recuperação de bacteriófagos nos ensaios de epimastigotas, mostrando uma relativa preferência de ligação dos bacteriófagos as epimastigotas.

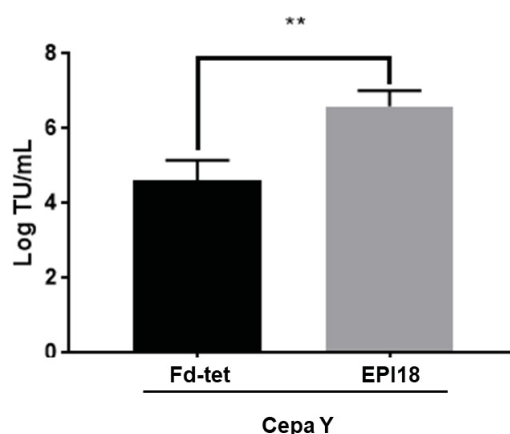


Figura 11. Clone EPI18 interage de forma menos eficiente a tripomastigotas metacíclicos da cepa Y.

FONTE: O autor.

Nota: 10^7 de células tripomastigotas vivas foram incubadas com 10^{10} TU do clone EPI 18 ou fd-tet (fago que expressa o pVIII não modificado). A recuperação de fagos foi calculada como log de TU. T-student, $p < 0.001$ em todos os tratamentos.

O clone EPI18 foi testado também em ensaio de ELISA utilizando o anticorpo monoclonal Anti-M13 para analisar a reatividade dos bacteriófagos ao parasito fixado na placa. A média de ligação do clone EPI 18 foi entre 1.2-1.4 de absorbância a 495 nm, e o clone fd-tet teve um valor entre 0,3-0,4 em cada cepa. Os resultados do ensaio mostram que houve diferença significativa do clone EPI18, que mostrou uma reatividade maior entre 3-5 vezes maior que o controle fd-tet, como pode ser visto na figura 12. Não houve diferenças significativas quando comparado os dados entre as cepas.

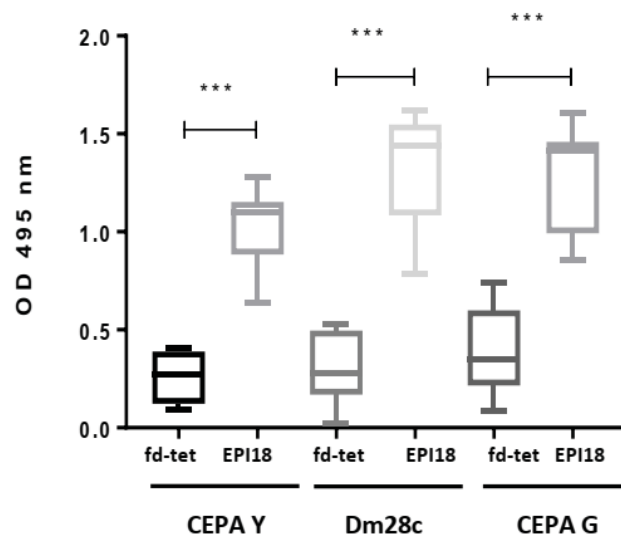


Figura 12. Ensaio de ELISA com bacteriófagos e células fixadas de 2 cepas e 1 clone diferentes de *T. cruzi*.

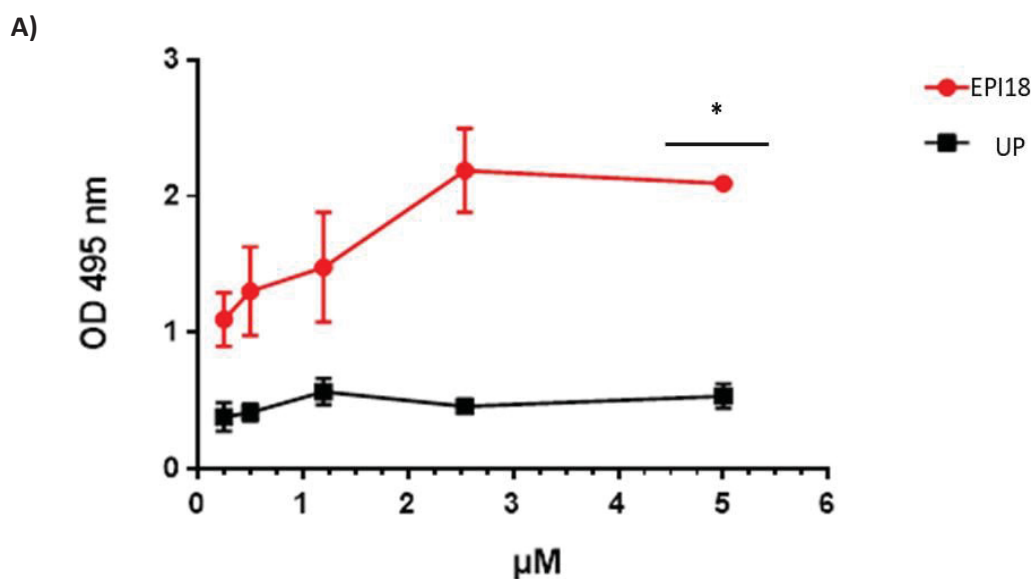
FONTE: O autor

Nota: . Foram fixados 10^6 epimastigotas, transferidos para placas de fundo redondo de 96 poços e incubados com 10^{10} TU de clone EPI 18 ou fd-tet. Após esta incubação, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-M13 (1: 2000).

6.5 EFICIENCIA DE LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO EPI18

A fim de melhor avaliar a capacidade de ligação do peptídeo EPI18 a superfície do parasito, resolvemos sintetizar e testar o peptídeo (gentilmente cedido pelo Professor Ricardo Machado-de-Ávila, da Universidade do Extremo Sul Catarinense). Para detectar a interação, o peptídeo EPI18 e um peptídeo controle (não relacionado) foram dosados e posteriormente biotinilados, uma vez que estes possuem lisinas na sequência que permitem essa marcação. Estes peptídeos foram posteriormente utilizados em ensaios de ELISA para calcular a faixa de eficiência de ligação. O peptídeo EPI18 possui capacidade de ligação na faixa de nanomolar, observando-se interação a partir de 250 nM (menor concentração testada), começando a observar-se a saturação a partir de 2 μ M. Como pode observar-se na figura 13A.

Foi realizado também ensaio de ELISA com a espécie da mesma família *Leishmania major*, para avaliar a especificidade do peptídeo com espécies relacionadas. Apesar de termos utilizado uma concentração elevada de 5 μ M, foi observado uma baixa reatividade do peptídeo comparado ao valor do peptídeo não relacionado e comparado com *T. cruzi* (figura 13B), reforçando uma capacidade de ligação específica.



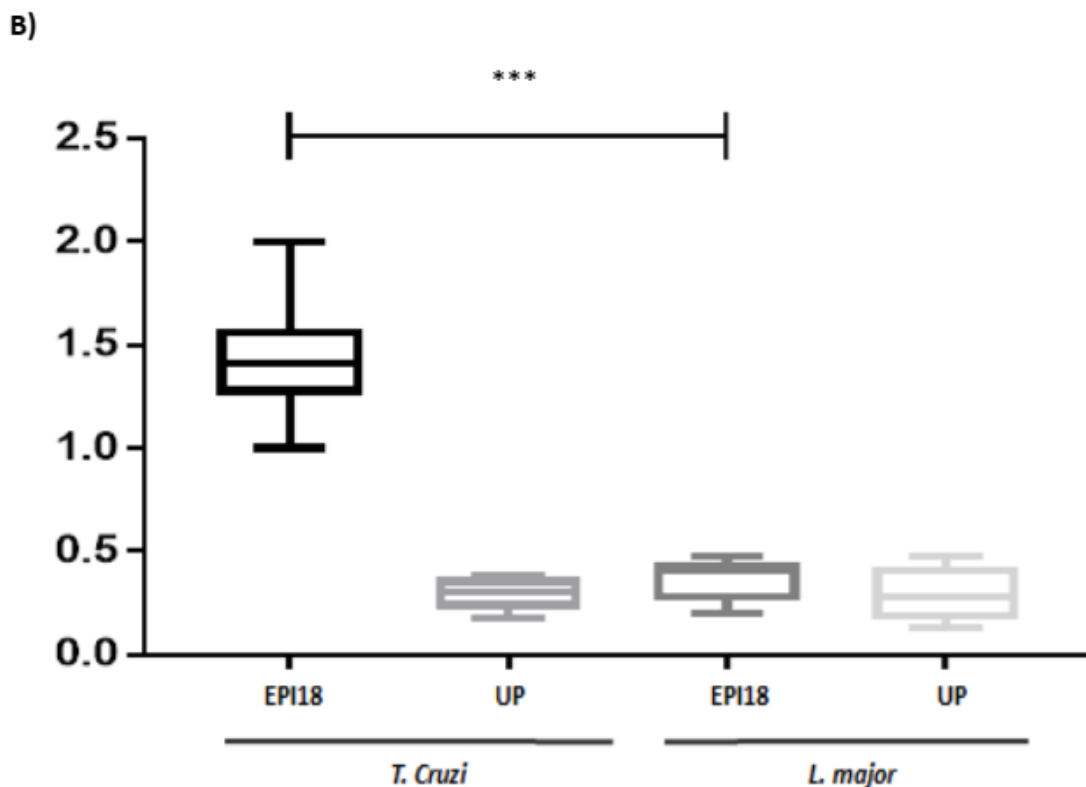


Figura 13. Capacidade de ligação do peptídeo sintético a superfície de *T. cruzi* e

***Leishmania major*.**

FONTE: O autor

Nota: A. ELISA com 1×10^6 epimastigotas incubados com peptídeos biotinilados numa concentração entre 0,25 a 5 μ M de EPI18 ou peptídeo não relacionado (UP - controle negativo). Em B. Ensaio de ELISA com promastigotas de *L. major*, 1×10^6 parasitos foram incubados com 5 μ M de peptídeo EPI18 e UP. T-student $p < 0.001$.

Aa figura 14 mostra os dados obtidos das análises de citometria de fluxo, incubando o peptídeo EPI18 biotinilado com as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos da cepa Y. O resultado mostra que 73,4% do total das epimastigotas apresentaram fluorescência, quando comparadas com os parasitos incubados apenas com estreptavidina-FITC. O peptídeo não relacionado apresentou apenas um total de 5% de células marcadas. Estes dados estão de acordo com os resultados de ELISA.

O peptídeo EPI18 liga 21 vezes mais eficientemente em epimastigotas do que em tripomastigotas metacíclicos, que apresentaram menos de 5% das células com fluorescência quando incubado com EPI18-biotinilado, não havendo diferença estatística em relação ao controle (6,5%) (figura 4B). É importante destacar que o peptídeo discrimina entre células de diferentes estágios (EPI e MT) e espécies da mesma família (*L. major*), segundo os dados combinados de ELISA e citometria de fluxo.

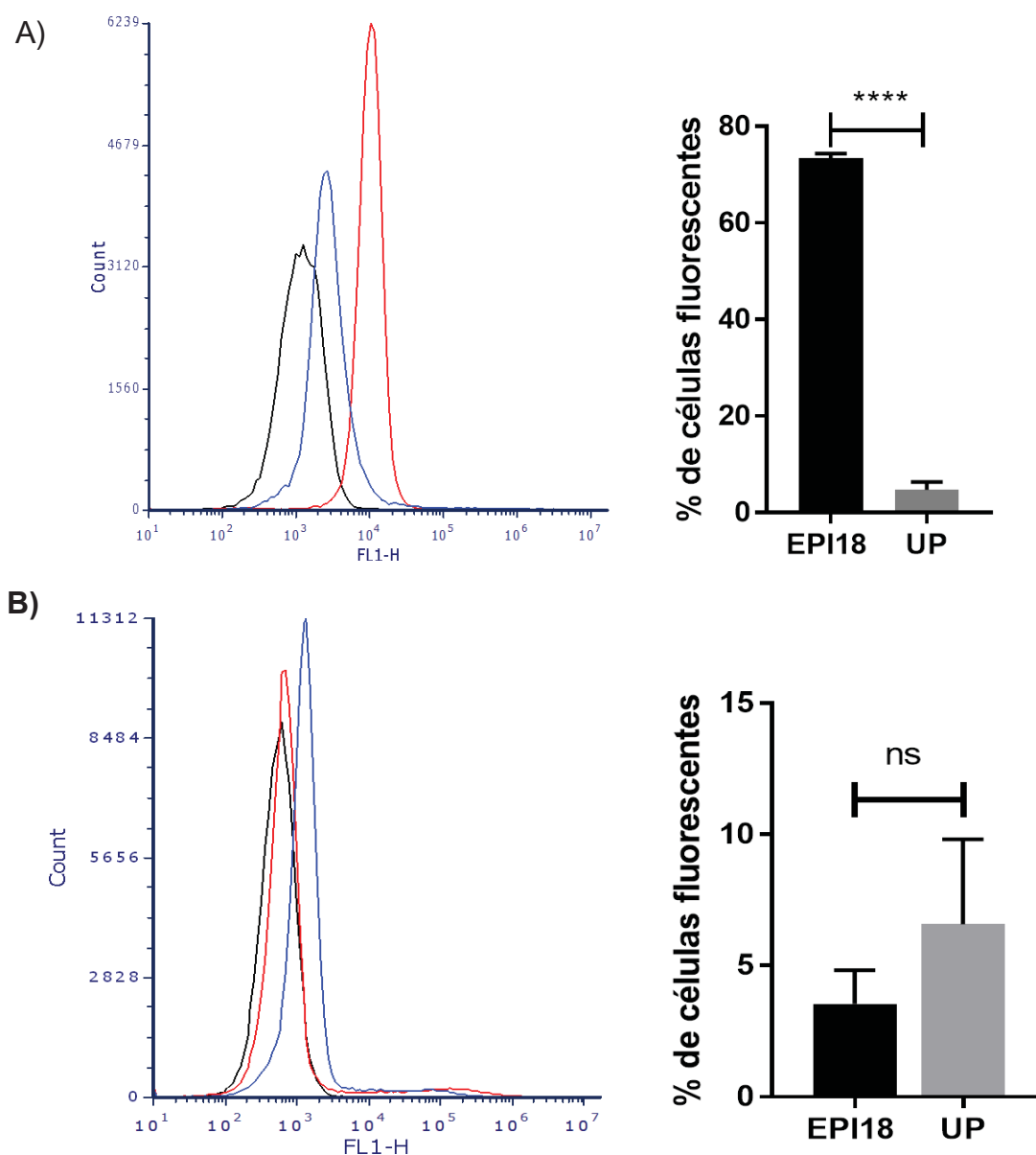


Figura 14. O alvo de EPI18 é mais expresso em epimastigotas do que tripomastigotas metacíclicos.

FONTE: O AUTOR

NOTA: A. Dados de citometria de fluxo de epimastigotas incubados com o peptídeo EPI18 ou UP, a linha preta corresponde a epimastigotas incubados com estreptavidina-FITC. A linha azul UP e a linha vermelha EPI18. Porcentagem de epimastigotas fluorescentes comparando o peptídeo EPI18 e UP, T student, $p < 0.001$, B. Dados de citometria de fluxo com tripomastigotas, a linha preta corresponde a tripomastigotas metacíclicos incubados com estreptavidina-FITC, linha azul UP e a linha vermelha com EPI18. Em B, porcentagem de tripomastigotas fluorescentes comparando o peptídeo EPI18 e UP, T student, $p < 0.086$

Os dados de microscopia confocal confirmaram os resultados obtidos nos testes de ELISA e citometria de fluxo, onde o peptídeo EPI18 apresentou uma maior capacidade de ligação mostrada pela intensidade de fluorescência e

o número de parasitos verdes, quando comparado com os parasitos incubados com o peptídeo não relacionado. A microscopia também mostrou que a ligação ocorre principalmente na membrana, ou seja, o alvo do peptídeo é provavelmente uma molécula de membrana estágio específica (Figura 15).

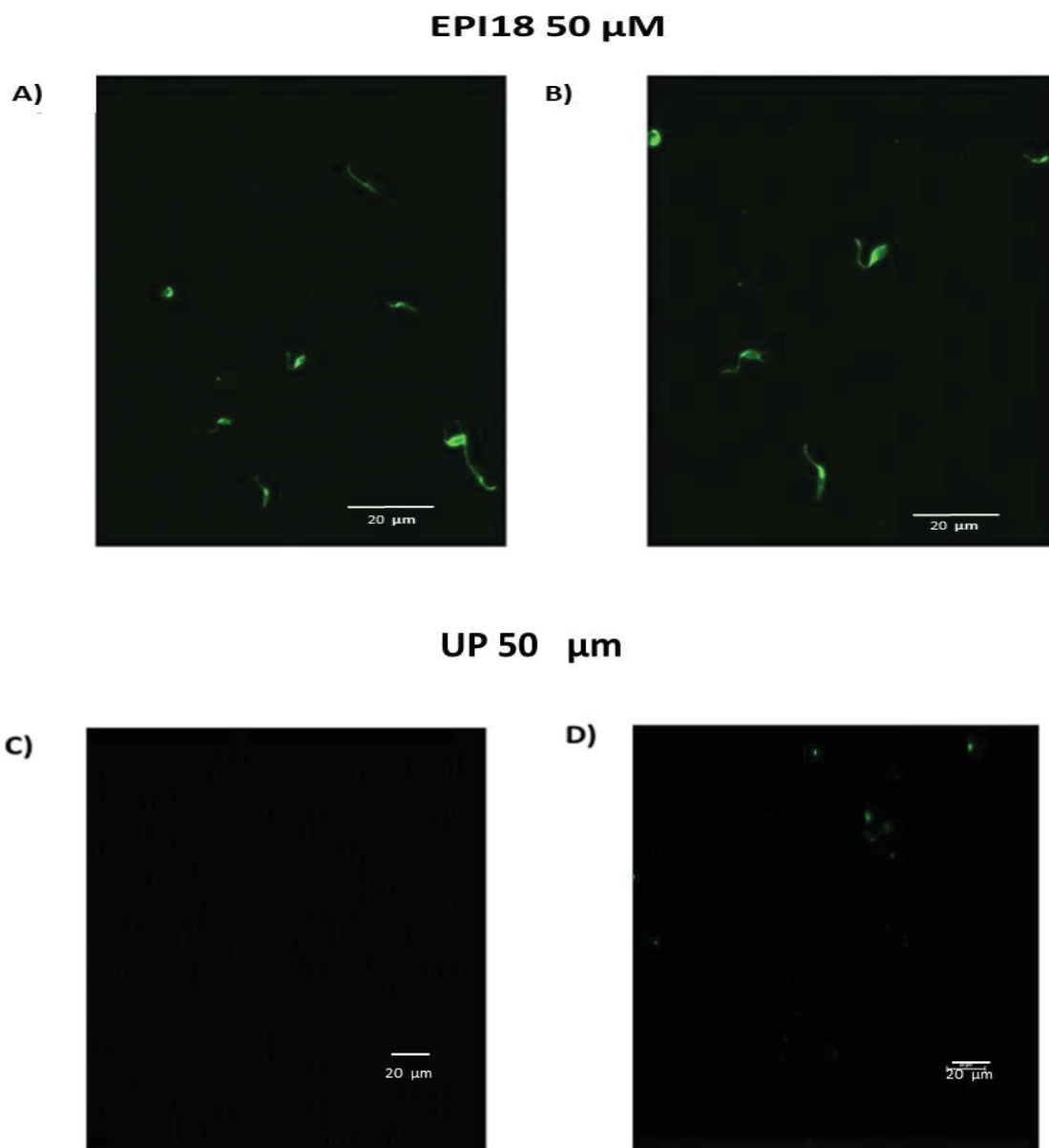


Figura 15. O peptídeo EPI18 interage com na superfície de parasitos epimastigotas da Cepa Y. Figura 16. Calculo de IC50 do peptídeo EPI18.

FONTE: O AUTOR.

Nota: A) As imagens foram obtidas por microscopia confocal utilizando lente objetiva de 60x.com Zoom digital 2,2. Parasitos incubados com peptídeo EPI18 50 μ M. B).Réplica do experimento A. Parasitos incubados com peptídeo EPI18 50 μ M. C) As imagens foram obtidas por microscopia confocal utilizando lente objetiva de 60x. Parasitos incubados com peptídeo UP 50 μ M, D) Réplica do experimento C. Parasitos incubados com peptídeo UP 50 μ M.

6.6 A LIGAÇÃO DE EPI18 A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS INTERFERE EM SEU DESEMPENHO?

Uma vez que a ligação de alguns *nanobodies* a superfície de *T.brucei* tem interferido com a viabilidade celular, resolvemos avaliar a capacidade lítica do peptídeo, realizando ensaios de incubação com doses crescentes do peptídeo sintético. EPI18 possui uma relativa carga positiva devido a presença de lisinas (K), porém não contém arginina (R). Decidimos fazer o ensaio devido a que, os peptídeos que ancoram na membrana apresentam abundantes resíduos de aminoácidos com carga positiva, principalmente arginina (Rádís- Baptista *et al.*, 2017). Na figura 16 observa-se os dados de incubação do peptídeo sintético com os parasitos da cepa Y. A mais alta concentração de 200 μM não provocou lise celular e não deteve o crescimento das culturas, calculando o $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ (Figura 16).

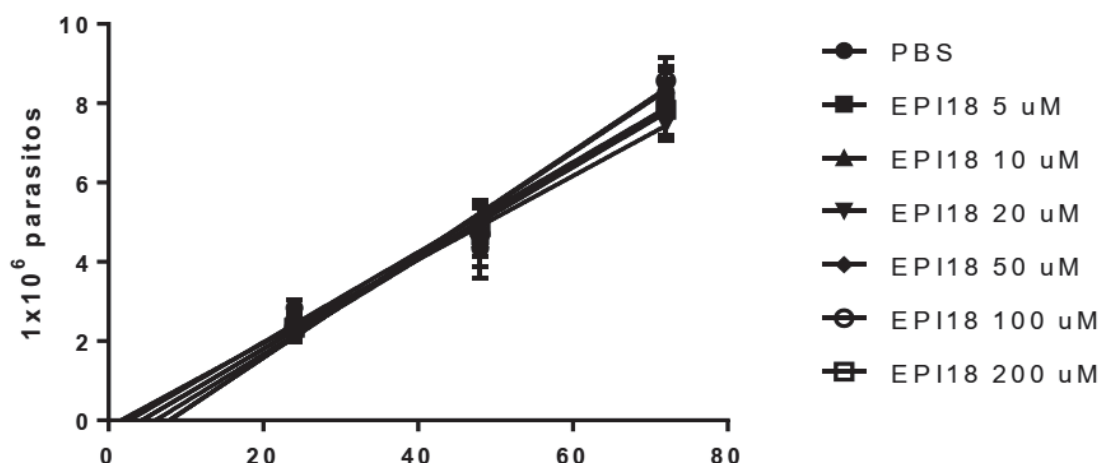


Figura 16. Cálculo de IC_{50} do peptídeo EPI18.

FONTE: O autor

NOTA: Durante 72 horas foram incubados epimastigotas com concentrações crescentes do peptídeo EPI18. PBS é o diluente utilizado para preparar a solução de trabalho do peptídeo EPI18.

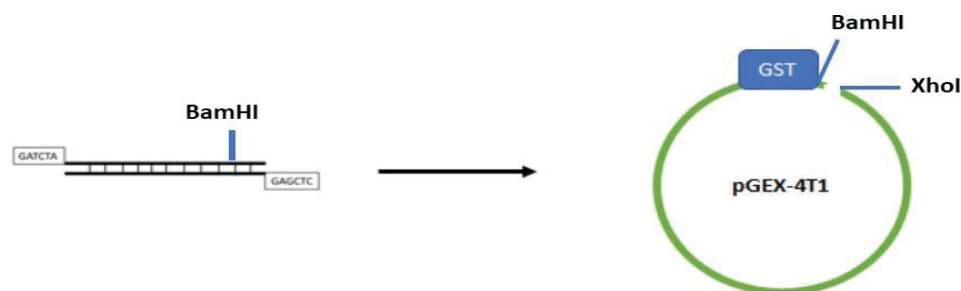
6.7 PROTEÍNAS DE FUSÃO A EPI18 SÃO CAPAZES DE INTERAGIR COM A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS?

Demonstrada a ligação do peptídeo EPI18, o próximo passo era testar se a sequência EPI18 fusionada com uma proteína solúvel poderia direcioná-la para a superfície do parasito? Para isso oligonucleotídeos que codificam a

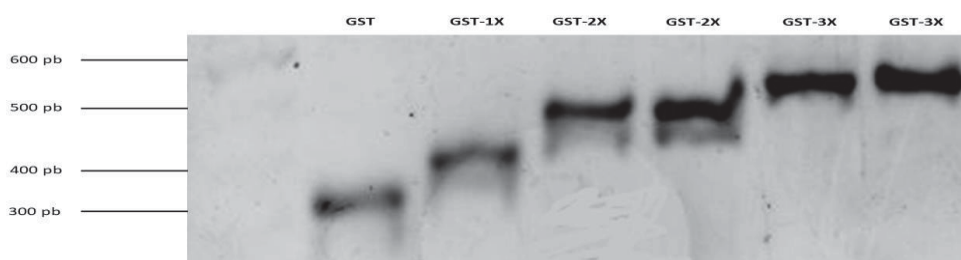
sequência de EPI18 foram anelados e ligados ao plasmídeo pGEX-4T1 que codifica para Glutathione S-Transferase (GST). GST é uma proteína solúvel, que já foi previamente conjugada com várias proteínas, e tem a vantagem de ter alto rendimento com alto grau de pureza (Harper; Speicher, 2011).

A estratégia de clonagem utilizada permite também fusionar sequências repetidas do clone EPI18, para serem traduzidas em *tandem* junto com GST, produzindo proteínas conjugadas com o EPI18 (GST::EPI18-1x), e até três sequências de EPI18 (GST::EPI18-3X). Após as etapas de clonagem (Figura 17A e B) os plasmídeos pGEX recombinantes foram submetidos a protocolos para indução da expressão e purificação de GST::EPI18-1X. Uma repetição de EPI18 não interferiu com a eficiência de indução, solubilidade, e purificação da proteína GST (Figura 17C).

A)



B)



C)

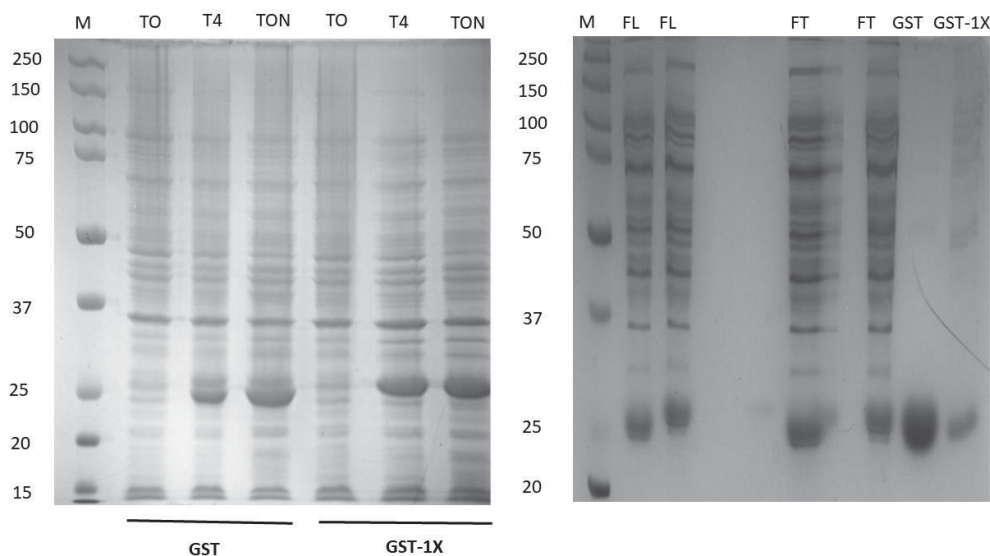


Figura 17. Estratégia, clonagem, expressão e purificação de EPI18 fusionado a proteína GST.

FONTE: O autor

NOTA: A) o plasmídeo pGEX-4T1 foi digerido com as enzimas BamHI e XhoI, os oligonucleotídeos sintéticos são anelados e ligados ao plasmídeo digerido. A sequência dos oligonucleotídeos contém um sítio BamHI, e danifica o BamHI do vetor, permitindo a inserção de múltiplas cópias dos oligonucleotídeos em *tandem*. B. Confirmação dos plasmídeos contendo a sequência EPI18, GST (368 pb), GST-1X (426 pb), GST-2X (484 pb) e GST-3X (542 pb). C. purificação e expressão das proteínas GST e GST-1X, M (marcador), T0 (Tempo zero de indução), T4 (4 horas posterior a indução), TON (16 horas posterior a indução), FL (Fração de lavagem), FT (*Flow Through*).

Com o objetivo de confirmar que o nosso peptídeo poderia endereçar proteínas para os epimastigotas de *T. cruzi*, utilizamos a proteína previamente purificada e incubamos com os parasitos em um ensaio preliminar, para avaliar a eficiência de ligação utilizando a técnica de *Western blot* com o anticorpo anti-GST para visualizar a quantidade de proteínas recuperadas. Uma limitação da técnica, é que o resultado mostra somente o extrato total do parasito, incluindo as proteínas que foram endocitadas. O resultado preliminar (figura 18) mostra que não houve diferença com respeito ao grau de recuperação das duas proteínas. O plasmídeo GST::EPI18-3X o qual possui 3 sequências em tandem de EPI18 será expressa e purificada, a proteína será avaliada a sua capacidade ligante.

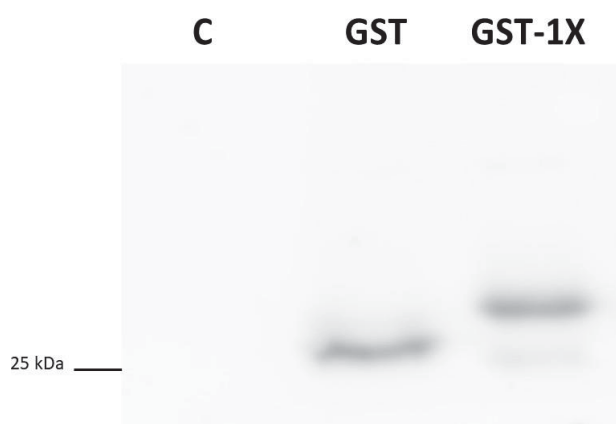


Figura 18. Western blot de extrato de proteínas de parasitos previamente incubados com proteínas GST e GST-1X.

FONTE: O AUTOR

NOTA: aproximadamente 0.2×10^6 parasitos foram separados em gel de SDS-PAGE, poliacrilamida 12% e incubados com anticorpo anti-GST, numa diluição 1:10000. C. controle de epimastigotas não incubados com nenhuma das proteínas, GST. Epimastigotas incubados com a proteína GST recombinante. GST-1X epimastigotas incubados com a proteína contendo a sequência do peptídeo EPI18.

6.8 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* A PARTIR DA BIBLIOTECA DE BACTERIÓFAGOS L_{X15}

A busca de peptídeos ligantes utilizando a biblioteca L_{X8CX8} retornou uma falta de variabilidade, o que não era esperado. Diante disso, resolvemos selecionar clones em uma biblioteca similar, a L_{X15} utilizando o mesmo

protocolo, eluindo com *pellet* de bactéria *E. coli* K91. Após a captura dos fagos ligantes do 4º *biopanning* com a cepa Y utilizando excesso de bactérias *E. coli* K91, obteve-se um enriquecimento de 10 vezes a mais do que o título da primeira rodada. A fim de testar uma segunda forma de recuperação de fagos, que poderia recuperar fagos inacessíveis à recuperação feita com a bactéria, decidimos realizar paralelamente o *biopanning* com eluição ácida (pH 2,0) como descrito em materiais e métodos no item 5.4.

O método de eluição de bacteriófagos com solução ácida mostrou uma maior taxa de recuperação na quarta rodada de *biopanning* (~270 vezes), quando comparado com o título da primeira rodada. Mostrando um enriquecimento maior que aquele observado na eluição de bacteriófagos com bactéria (10 vezes) (Figura 19A). De forma similar comparamos o enriquecimento de clones com os encontrados quando feito o *biopanning* com a biblioteca L_{X8CX8}, observamos na quarta rodada uma recuperação similar (Figura 5), porém com uma recuperação de mais clones durante o primeiro *biopanning*.

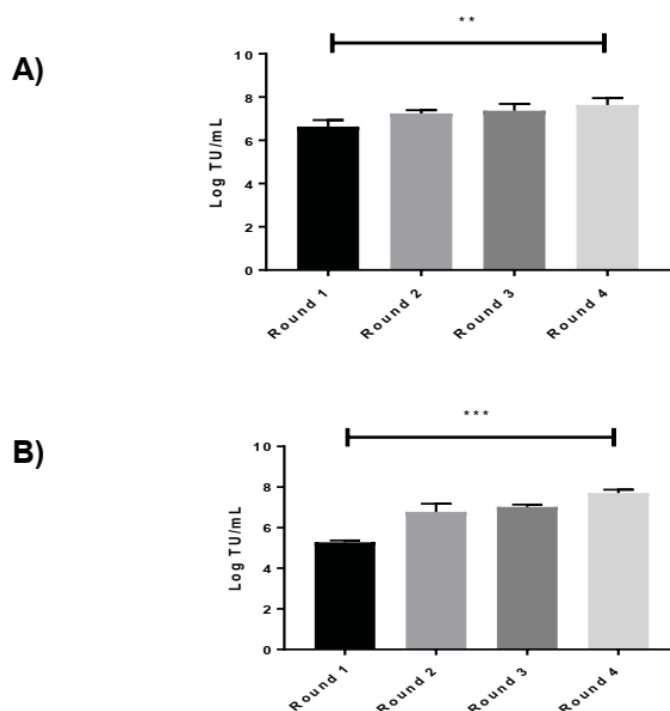


Figura 19. *Biopanning* com biblioteca LX15

FONTE: O autor

NOTA: Painei A. Título por ml de bacteriófagos isolados em *biopanning* com a biblioteca de bacteriófagos L_{X15} eluídos com incubação de bactéria K91, Anova One Way, $p < 0.0001$. Em B. Títulos por ml de bacteriófagos isolados em *biopanning* com a biblioteca de bacteriófagos L_{X15} eluídos com solução de Eluição (Glicina 0,2 M, pH 2,0) Anova One Way, $p < 0.0001$, cada

biopanning foi feito com 1×10^{12} TU, os dados de recuperação se apresentam como o logaritmo do título de bacteriófagos calculado segundo descrito em materiais e métodos.

Para sequenciar os clones da biblioteca L_{X15} , tivemos que realizar um passo adicional de amplificação do DNA viral. Os produtos das segundas re-amplificações foram obtidos >15 ng/ μ L, o que permitiu o sequenciamento de 30 amostras. Com esta biblioteca observamos uma maior variabilidade nas sequências obtidas.

A análise do sequenciamento dos 30 clones advindos das duas estratégias de eluição (15 de cada) apontou 13 sequências distintas (não repetidas), dos quais 2 foram encontrados em ambas formas de recuperação de bacteriófagos, 4 foram únicos para a eluição com bactéria e 7 para a eluição ácida (Figura 20). A tabela 5 mostra as frequências de identificação de cada sequência independentemente do método de eluição. Mostrando que existe uma variação razoável dependendo do método de eluição utilizado, porém permitindo isolar algumas sequências idênticas, em comum das duas estratégias.

O clone HGK-1 foi o mais frequente dos 30 sequenciados, sendo que não houve diferença significativa quando comparado com as frequências dos outros clones. Existem 7 sequências que não se repetem. Encontramos nas sequências, que o aminoácido mais frequente após a tradução *in silico* dos peptídeos identificados foi a serina (aminoácido polar não carregado), e em menor proporção foi a fenilalanina (aminoácido aromático hidrofóbico) diferentemente de Triptófano da mesma categoria.

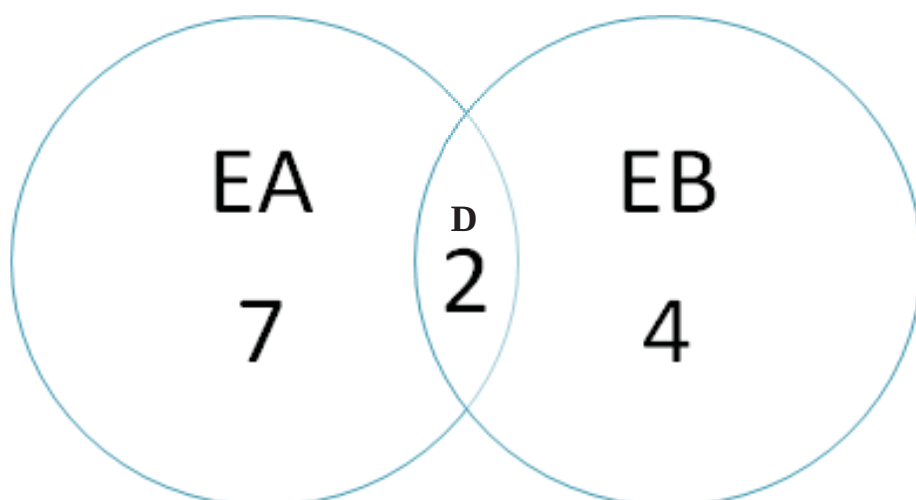


Figura 20. Análises das sequências obtidas no *biopanning* da biblioteca LX15.

FONTE: O AUTOR

NOTA: (A) EA bacteriófagos que foram isolados utilizando a eluição acidam e EB bacteriófagos que foram isolados incubando o *pellet* do parasito com excesso de bactéria. O gráfico mostra o número de bacteriófagos que foram identificados em ambas às estratégias de eluição (D).

(B) Frequência das sequências obtidas dos bacteriófagos ligantes da biblioteca LX₁₅, os peptídeos foram identificados com as primeiras três letras da sequência do peptídeo, foram sequenciados um total de 30 clones. N=30, EA=15, EB=15.

Tabela 5. Frequências dos peptídeos identificados na etapa de sequenciamento de clones isolados da biblioteca LX15.

Peptídeo	Sequência	Frequência	Porcentagem
HGK-1	HGKXXXXXXXXXXXXX	6	20
GGK-1	GGKXXXXXXXXXXXXX	4	13,3
SPM-1	SPMXXXXXXXXXXXXX	4	13,3
MSR-1	MSRXXXXXXXXXXXXX	4	13,3
YHQ-1	YHQXXXXXXXXXXXXX	3	10
LPP-1	LPPXXXXXXXXXXXXX	2	6,67
RPE-1	RPEXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
QVS-1	QVSXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
PCD-1	PCDXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
MTA-1	MTAXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
HTR-1	HTRXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
SNL-1	SNLXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
RMI-1	RMIXXXXXXXXXXXXXX	1	3,3
Total		30	100

Realizamos uma busca de motivos conservados das 13 sequências únicas, utilizando a ferramenta MEME (<http://meme-suite.org>). Encontramos quatro motivos conservados entre as sequências peptídicas, como apresentado na figura 21. O motivo KXXXXC identificou-se na sequência do peptídeo EPI18 isolado da biblioteca LX_{8CX8} e HGK-1 encontrado em clones eluídos com os

ambos métodos de eluição. O motivo YXXXXG encontrado em YHQ-1 eluídos nos dois métodos e no PCD-1 (EA), o motivo WXXXXI encontrado também em YHQ-1 e na sequência peptídica de MSR-1 (EA), o último motivo RXXXXL em 3 sequências de peptídeos, LPP-1 (EB), QVS-1 (EA) e RMI-1 (EA). Dos 13 clones não repetidos, 7 apresentam motivos conservados. Entre os motivos identificados observamos clones de diferentes métodos de eluição, cabe destacar que observamos que o peptídeo mais frequente da biblioteca L_{X15} possui um motivo conservado com a sequência EPI18 (6 resíduos de aminoácidos).

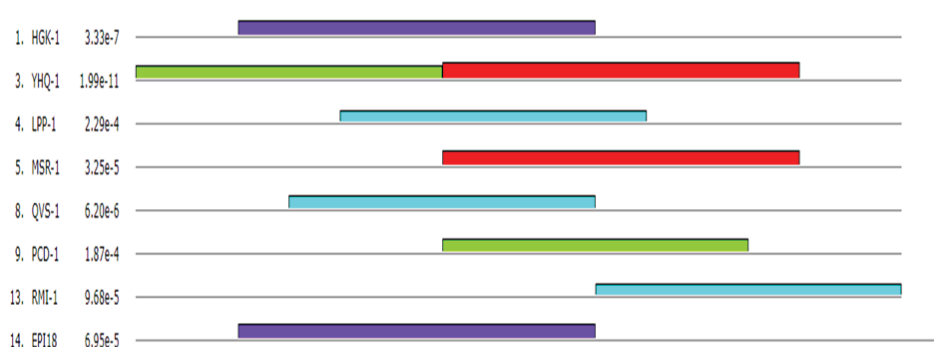


Figura 21. Localização dos motivos conservados encontrados em peptídeos de clones da biblioteca L_{X15}.

FONTE: O autor.

NOTA: A barra azul representa o motivo KXXXXC, verde YXXXXG, vermelha WXXXXI e azul claro RXXXXV.

Similarmente ao descrito para o clone EPI18, tentamos identificar se os peptídeos identificados aqui eram miméticos de alguma interação parasito:inseto. A análise de BlastP dos peptídeos contra a base de dados proteínas de triatomíneos geraram hits para 8 dos 13 peptídeos (Tabela 5). Como esperado, os *E-values* eram altos, contudo, 6 dos 8 peptídeos tiveram como *Top hits* proteínas descritas como lipocalina de duas espécies importantes, *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Para avaliar/confirmar a relevância desses dados, experimentos adicionais precisam ser realizados e até mesmo experimentos similares aos realizados para o clone EPI18. Os dados apresentados até o momento são bastantes promissores e esperamos confirmar desses dados e realizar ensaios funcionais com esses peptídeos e EPI18.

TABELA 6. IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO PARASITO:HOSPEDEIRO INVERTEBRADO, COMPARANDO OS CLONES ISOLADOS DA BIBLIOTECA LX15, COM A BASE DE DADOS DE TRIATOMÍNEOS.

Peptídeo	Descrição da sequência encontrada no banco de dados usando a ferramenta BlastP	Cobertura do peptídeo	E-value	Identidade
HGK-1	salivary lipocalin (<i>Triatoma brasiliensis</i>)	60%	0,45	57%
GGK-1	salivary lipocalin (<i>Triatoma infestans</i>)	66%	7,5	47%
LPP-1	salivary lipocalin (<i>Triatoma brasiliensis</i>)	26%	11	75%
MSR-1	salivary lipocalin (<i>Triatoma infestans</i>)	33%	15	80%
RMI-1	salivary lipocalin (<i>Triatoma infestans</i>)	26%	11	100%
QVS-1	salivary lipocalin (<i>Triatoma infestans</i>)	66%	7,6	60%
SPM-1	salivary secreted protein (<i>Triatoma infestans</i>)	26%	11	100%
PCD-1	putative rab11 (<i>Triatoma infestans</i>)	26%	11	100%
YHQ-1	Não foi encontrado nenhum hit.			
RPE-1	Não foi encontrado nenhum hit.			
MTA-1	Não foi encontrado nenhum hit.			
HTR-1	Não foi encontrado nenhum hit.			
SNL-1	Não foi encontrado nenhum hit.			

7. DISCUSSÃO

Phage display é considerado uma técnica padrão para identificação de peptídeos ligantes utilizando bacteriófagos recombinantes, sendo que sua variação para identificar ligantes a células intactas é denominada *biopanning* (McGuire *et al.*, 2009). As bibliotecas utilizadas neste tipo de experimentos e que foram utilizadas aqui apresentam tamanho inicial de $2,5 \times 10^8$ com 12,5% de fago não recombinante para LX8CX8 e 1×10^{10} com 0% de fago não recombinante para LX15 (Bonnycastle *et al.*, 1996). Considera-se que o número de 3-6 *biopannings* sejam suficientes para isolar clones com alto grau de ligação (Watters, Telleman, e Junghans 1997). Essa estratégia tem permitido identificar novos receptores de membrana, como por exemplo, a descrição do receptor prokinectin de células mamíferas que participa no processo de infecção de *T. cruzi* (Khusal *et al.*, 2015).

A otimização do protocolo de *biopanning* utilizado em células mamíferas de (Barry *et al.* 1996), demonstrou que a temperatura de 4°C foi ótima para isolar bacteriófagos com capacidade para discriminar células, quando comparado com os bacteriófagos ligantes a 37°C. Estes últimos eram capazes de ligar na maioria das diferentes linhagens celulares às quais foram expostos, provavelmente por ligarem a proteínas da via endocítica, conservadas na maioria das células. Em nossos experimentos de padronização foi visto que não há diferenças de títulos (TU/mL) em relação a temperatura e condição do parasito. Todavia, resolvemos realizar os experimentos a temperatura baixa, devido ao fato que em *T. cruzi*, a taxa de endocitose é diminuída a 4°C (de Figueiredo e Soares, 2000). Bacteriófagos que alvejassem proteínas da via endocítica teriam uma maior taxa de internalização e seriam provavelmente degradados na fase final da via da endocitose, dificultando sua recuperação.

Para realizar o *biopanning*, existem outras técnicas, uma delas é o método conhecido como BRASIL descrito por (Giordano *et al.* 2001), onde uma mistura de compostos orgânicos (phthalate:cyclohexane) forma duas fases na solução de *biopanning*. Os bacteriófagos aderentes a células ficam na fase orgânica, a técnica é feita num único passo diminuindo as etapas de lavagens e rodadas necessárias. Outra metodologia descrita é o sequenciamento em

larga escala utilizando a tecnologia *lon torrent* para identificar numa única etapa de *biopanning* os clones mais abundantes, através do número de sequências obtidas (*reads*), e comparando a semelhança dos motivos das sequências isoladas (Rentero-Rebollo *et al.* 2014).

As estratégias descritas anteriormente apresentam a vantagem de diminuir o tempo de seleção e os vieses inerentes a técnica, porém são necessárias infraestruturas com equipamentos custosos (sequenciadores) e reagentes de alto custo. A metodologia clássica utilizada neste trabalho permitiu um enriquecimento dos clones como visto na Figura 6. Os experimentos foram realizados com reagentes de baixo custo, disponíveis em qualquer laboratório, permitindo com sucesso o isolamento de bacteriófagos ligantes a superfície de epimastigotas de *T. cruzi*.

Em nosso projeto foram testados dois iniciadores, o iniciador Claude_Rev e o iniciador Fw-88.1, no trabalho de (Ferrières *et al.* 2000) o iniciador Claude_Rev foi utilizado com sucesso para o sequenciamento. Nas nossas condições observamos que o primer Fw 88.1 foi mais eficiente comparado ao Claude_Rev, para obter sequências de boa qualidade. Provavelmente, o valor de T_m do primer (57°C) e as concentrações de sal e dNTP usadas nas reações, além de um passo adicional de purificação, utilizando a enzima EXO-SAP para purificar o produto de PCR (Thermo- Fisher), sejam as razões da eficiência para dito iniciador.

Após as sessões de *biopanning* com a biblioteca LX₈CX₈, o sequenciamento mostrou um único clone, nomeado EPI18. Nós trabalhos realizados com células ou tecidos, mostram que é possível isolar sequências únicas (Hou *et al.*, 2018 e Mann *et al.*, 2017), ou uma quantidade reduzida de clones ligantes (Chi *et al.*, 2017 e Fukuta *et al.*, 2017). Esses clones identificados, mostraram padrões de ligação eficientes às células, quando foi sintetizada a sequência correspondente ao peptídeo. Apesar desses resultados da literatura, esperávamos uma maior complexidade, compatível com a complexidade da superfície celular.

A sequência obtida do *biopanning* com a biblioteca LX₈CX₈ foi submetida a pesquisas BlastP com intuito de avaliar a possibilidade de ter sido encontrado

um peptídeo mimético, ou seja, que se assemelhe a proteínas interatoras com a superfície de epimastigotas. Peptídeos dito miméticos frequentemente simulam sítios de ligação descontínuos. É frequente o uso de bibliotecas de *Phage display* para identificar peptídeos miméticos, principalmente para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas em protozoários (Salles *et al.* 2017), ou para ser testados como possíveis candidatos para a produção de vacinas (Laralde; Petrik, 2017). Porém não é possível com nossos dados, excluir a possibilidade de uma ligação inespecífica pela interação eletroestática dependente da carga dos aminoácidos do peptídeo EPI18.

Com o objetivo de conhecer as proteínas que o nosso peptídeo poderia mimetizar, comparamos a sequência do clone EPI18 com bases de dados de proteínas de humanos e triatomíneos por meio da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Utilizamos o algoritmo Blast-p onde e a matriz BLOSSUM-45, para comparar nossa sequência, essas configurações são empregadas para alinhamentos locais e proteínas divergentes (Baussand *et al.*, 2007). Esperamos uma alta divergência entre as sequências encontradas, devido a que existem mais de cem espécies com potencial para atuarem como vetores, no entanto, apenas o genoma completo de *Rhodnius prolixus* foi sequenciado recentemente (Mesquita *et al.* 2015). Outras sequências disponíveis, são os genomas mitocondriais de *Triatoma infestans* e *Triatoma dimidiata*, (Dotson; Beard, 2001 e Pita *et al.*, 2017). O que reduz a qualidade das correspondências encontradas. Existem outras informações disponíveis nas bases de dados, correspondentes a bibliotecas de cDNA (DNA complementar) ou proteínas identificadas em estudos de proteomas, trabalhos focados principalmente em componentes das glândulas salivares e intestinos (Garcia *et al.*, 2007 e Hernández-Vargas *et al.*, 2017). A maioria destes dados disponíveis não tem sido curados e carecem de confirmação experimental. Limitando as conclusões que podemos determinar a partir de nossos resultados.

As sequências retornadas utilizando o BlastP com *E-value* menor que 10 foram consideradas para análise. Nesses resultados que podem ser vistos na Tabela 4, duas proteínas correspondem ao secretoma dos vetores indicados, a proteína pallidipina-like e aspartil protease. A proteína pallidipina-like da

espécie *Panstrongylus chinai* (Kato *et al.*, 2017), pertence a família de proteínas Lipocalin. O domínio conservado é encontrado numa variedade de organismos, desempenhando uma pluralidade de funções (Flower *et al.*, 2000). Uma questão interessante é que muitas destas proteínas desempenham-se como transportadores de moléculas hidrofóbicas, um exemplo são as proteínas ligantes de retinol, histamina e prostaglandinas, e em procariotas funcionam como ligantes de ácidos graxos e fosfolipídios (Grzyb *et al.* 2006).

Os dados de conservação são superficiais para permitir uma especulação funcional dessa provável interação. Contudo parece promissor ensaios adicionais com a proteína recombinante ou com a porção peptídica sintética para avaliar essa provável interação, uma vez que apesar de não existir evidência experimental da função de pallidipin-like, a semelhança estrutural com pallidipin pode indicar uma possível conservação de função na inibição de coagulação (Noeske-Jungblut *et al.* 1994) e como isso afetaria a biologia de epimastigotas.

Outro aspecto interessante da proteína é que aparentemente a região na alça dos primeiros seis resíduos, não forma parte do domínio conservado lipocalin, a diferença da região de aminoácidos 61-63. É possível que a alça (1-5 aminoácidos) seja específica para essa proteína de *Panstrongylus chinai* (Kato *et al.*, 2017). Se fosse demonstrado *in vivo* dita especificidade, a utilidade para nosso peptídeo seria destinada para um único inseto vetor. Porém destaca-se que as lipocalin apresentam similaridade estrutural, com uma conservação baixa na sequência de aminoácidos. A comparação desta família de proteínas, mostra que na estrutura secundária podem ser inseridas várias mutações sem afetar a estrutura geral da proteína (Flower *et al.*, 2000).

É interessante que proteínas denominadas Lipocalinas, também pescadas nas pesquisas BlastP realizadas com a biblioteca LX15, o que mostra uma certa coerência dos dados obtidos. No entanto como mencionamos durante a discussão do clone EPI18, as proteínas Lipocalin e outras proteínas secretadas por glândulas salivares ou secretadas no intestino, se apresentam numa frequência alta nos bancos de dados. O que aumenta o risco que as proteínas identificadas através do BLAST sejam correspondências aleatórias.

Como discutido previamente as proteínas lipocalin desempenham distintas funções no inseto vetor. Para acrescentar, no inseto vetor as proteínas nitroforinas protegem o óxido nítrico da oxidação (Weichsel *et al.*, 1998), também participam na captura de aminas ativas como a histamina para diminuir o dor no sítio da picada (Ribeiro; Walker, 1994). Outras lipocalina tem atividade anticoagulante como a triabina e palidipina. A análise das sequências isoladas da biblioteca L_{X15} identificaram Lipocalinas de diferentes espécies como potenciais interatores.

A outra proteína encontrada com a ferramenta de BLAST foi a aspartil protease de *Triatoma infestans*, que é secretada no intestino médio em triatomíneos, diferente de outros insetos como *Aedes Aegyptis*, onde a enzima encontra-se localizada intracelularmente e participando em degradação de proteínas nos lisossomos (Cho; Raikhel, 1992). Observou-se que durante a colonização do vetor por epimastigotas de *T. cruzi* aumenta a expressão e secreção da enzima no intestino médio (Borges *et al.*, 2006).

Os ensaios de ligação do peptídeo sintético ou clone isolado em epimastigotas e tripomastigotas demonstraram que o peptídeo EPI18 possui uma ligação específica para epimastigotas de várias cepas, uma vez que não se ligaram em espécies relacionadas como *L. major*, ou em formas tripomastigotas metacíclicas. Para o nosso trabalho escolhemos as formas epimastigotas de *T. cruzi*, devido a que são as formas que replicam no inseto vetor, com alta capacidade metabólica (Barisón *et al.*, 2017). E os peptídeos isolados poderiam ser utilizados para atingir populações no inseto vetor. Os epimastigotas expressam diferencialmente moléculas do metabolismo intermediário e proteínas importantes para a adesão nas células epiteliais do inseto (Dallagiovanna *et al.*, 2001).

Tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas derivados de células expressam diferencialmente proteínas, associadas com a infecção ao hospedeiro. Através de proteômica (Cordero *et al.*, 2009), demonstrou-se uma expressão diferencial em MT e TCT de proteínas como a protease gp63, membros da família gp85/TS como gp82, gp90 e gp35/50, MASP e mucinas, que participam no processo de infecção e evasão da resposta imune (ver Tabela 1).

É importante considerar outras macromoléculas como possíveis alvos além das proteínas, a membrana do parasito apresenta abundantes glicoproteínas ancoradas por GPI, lipofosfoglicanos (LPG) e glicoinositolfosfolípidos (GLPI), as quais são altamente glicosiladas. Entre as GPI abundantes em epimastigotas e tripomastigotas podemos citar as mucinas, que são altamente glicosiladas e são as proteínas aceptoras de ácido siálico proveniente do hospedeiro, transferido pela enzima transialidase. É considerado que a glicosilação destas proteínas, corresponde a um 60% da massa total (Buscaglia *et al.*, 2006). Além das mucinas outras proteínas como RHS (Retrotransposon Hot spot protein) e DGF-1 (Dispersed gene family-1) são altamente glicosiladas em epimastigotas e as proteínas MASP e gp63 em tripomastigotas metacíclicos (Alves *et al.*, 2017). É importante destacar a seletividade do peptídeo EPI18 para epimastigotas sugere que o alvo seja estágio específico.

Como comentado no item 6.7, tivemos a necessidade de realizar um *biopanning* com outra biblioteca (LX₁₅) com eluição ácida e eluição com excesso de bactéria, pela ausência de divergência nos clones sequenciados oriundos da biblioteca LX_{8CX8}. Os dois *biopanning* apresentaram diferenças consideráveis, tendo sido atingida maior variabilidade com a biblioteca LX₁₅. Essa diferença pode ser reflexo da diversidade de clones inicial devido aos eventos de amplificação que foram submetidas, além de já possuírem uma diversidade inicial diferencial (Bonnycastle *et al.*, 1996). O tamanho inicial da biblioteca LX_{8CX8} é $2,5 \times 10^8$ (12,5% de fago WT) e para LX₁₅ foi de 1×10^{10} (0% de fago WT). A variabilidade de clones pode ser favorecida pela estrutura da biblioteca, onde todos os aminoácidos são aleatórios, e carecem da cisteína conservada da biblioteca LX_{8CX8}, a qual pode interferir na reação contra proteínas de *T. cruzi*.

A eficiência dos dois métodos é similar para recuperar bacteriófagos ligantes, isto é útil quando é importante decidir que método de eluição utilizar quando for realizado o *biopanning* de outras formas. A observação realizada com respeito a eficiência só cabe para *biopanning* com células de protozoários de *T. cruzi*, um estudo amplo comparando a eficiência de ambos os métodos não foi realizado ainda, segundo o nosso conhecimento.

Identificamos o clone HGK-1 (LX15) como o mais frequente, porém não podemos concluir que tem um maior potencial de ligação com relação aos outros peptídeos ou ao clone EPI18, devido em parte ao tamanho da amostra que foi sequenciada. Testes para confirmar o grau de ligação com os peptídeos identificados são necessários. Identificamos também motivos semelhantes para peptídeos isolados com métodos diferentes de eluição, o que indica que a utilização de qualquer uma das duas metodologias, é capaz de isolar bacteriófagos ligantes para a um mesmo receptor. Os motivos identificados indicariam que os clones nesta biblioteca, ligam a mais de um receptor, das células epimastigotas (Ebrahimizadeh; Rajabibazl, 2014).

Os anticorpos produzidos pela resposta humoral de vertebrados têm uma massa aproximada de 150 kDa (IgG) e são incapazes de produzir a remoção total dos parasitos, os quais persistem nos tecidos (Gutierrez *et al.*, 2009). Parte dessa ineficiência pode ser atribuída à alta variabilidade antigênica já previamente comentada das proteínas de membrana, ou a internalização do parasito (Cardoso *et al.*, 2016). Já as sequências dos peptídeos identificados por *phage display* tem uma massa por volta de 2 a 3 kDa, sendo assim estes poderiam ser capazes de atingir epítomos crípticos, considerados mais conservados como o epítomo identificado na proteína VSG de *T. brucei* (Caljon, Guy *et al.*, 2012). Esses epitopos são inacessíveis aos anticorpos convencionais devido ao impedimento estérico. Um exemplo dessa inacessibilidade foi o isolamento de *Nanobodies* que ligam numa região conservada da glicoproteína variante de superfície de *T. brucei* (Stijlemans *et al.*, 2004). Estes *nanobodies* tem sido engenheirados para *delivery* de moléculas tripanosomicidas (Arias *et al.*, 2015), e tal abordagem poderia ser utilizada engenheirando peptídeos.

Nossos resultados também apresentam semelhanças com publicações anteriores, onde peptídeos ligantes de células podem diferenciar células e tecidos. Entre vários trabalhos publicados podemos destacar:

- Li *et al.* (2017) isolaram peptídeos ligantes de células de câncer de cerviz de útero. 6 clones foram reativos para as células cancerígenas e, segundo os autores, poderão ser utilizados para desenvolver testes de imagens e entrega de drogas;

- Qin *et al.* (2017) isolaram um peptídeo que distingue células de hepatocarcinoma das células hepáticas saudáveis, ligando a uma proteína específica das células cancerígenas;
- Samli *et al.* (2005) isolaram peptídeos específicos para ilhotas de Langerhans, com o interesse em desenvolver métodos de entrega para terapia gênica em pacientes com diabetes, ou para efetuar uma entrega de drogas tecido específica.

Estes trabalhos em outros sistemas mostram a potencialidade de uso desse sistema para alvejar as formas circulantes presente no hospedeiro mamífero.

Entre outras aplicações biotecnológicas do peptídeo EPI18, seria a melhoria da técnica de paratransgênese. Recentemente a estratégia tem progredido em modelos de protozoários de importância médica como a malária. O peptídeo SM1, um peptídeo isolado através da exposição da biblioteca XCX₈CX com o intestino médio e glândulas salivais do inseto *Anopheles gambiae* (Ghosh *et al.*, 2001), mostrou uma eficiência em diminuir a invasão dos esporozoítos nas glândulas salivais e dos oocinetos no intestino médio. Wang *et al.* (2017) isolaram uma bactéria da espécie *Serratia marcescens* a qual coloniza eficientemente o mosquito *Anopheles*, e persiste na descendência. Os autores modificaram geneticamente a bactéria para expressar moléculas anti-Plasmodium, diminuindo consideravelmente as populações de parasitos no inseto vetor. Abordagens para atingir *T. cruzi* no inseto foram comentados na revisão bibliográfica (Durvasula *et al.*, 1997), e também foi conseguido expressar polipeptídeos na bactéria *Sodalis glossinidius*, simbiote da mosca Tsé-tsé o inseto vetor de *Trypanosoma brucei* (De Vooght *et al.*, 2014). Contudo, essa estratégia precisa ser testada submetendo o vetor a infecção com parasitos.

Outra estratégia proposta é a transgênese, que consiste na modificação genética do vetor para a expressão de moléculas que diminuam a competência vectorial, danificando o protozoário, ou interrompendo as interações entre o parasito e inseto. Entre os desafios para realizar a técnica podemos mencionar a necessidade de integrar as sequências codificadoras (no

caso que a molécula seja uma proteína ou peptídeo) no genoma do inseto, que o sítio de integração permita a expressão constitutiva durante o ciclo de vida e que a expressão da proteína tenha uma vida média longa que permita a interação com o parasito (James *et al.*, 1999).

Estratégias como o *knockout* gênico clássico são trabalhosas, porém técnicas atuais de edição genômica como o CRISPR/Cas9 permitiram obter insetos vetores de malária modificados geneticamente. Foram gerados insetos que expressam *scFv* que alveja a proteína chitinase-1 e que comprometem o desenvolvimento do parasito no inseto (Gantz *et al.*, 2015 e Isaacs *et al.*, 2012).

É evidente a importância da técnica e a quantidade de peptídeos isolados com funções biológicas, atualmente existem bancos de dados de peptídeos miméticos sendo uma quantidade importante identificada por *phage display* (Huang *et al.*, 2012). Nós confirmamos a capacidade de ligação através de técnicas já estabelecidas baseadas em anticorpo, como ELISA, citometria de fluxo e microscopia confocal. O próximo passo deste trabalho é expressar EPI18 fusionado a peptídeos antimicrobianos e avaliar seus efeitos tóxicos. Paralelamente, pretendemos identificar o alvo do peptídeo, produzir a proteína recombinante e realizar ensaios que permitam determinar com maior precisão a eficiência de ligação com o alvo. Entre os ensaios o *Surface Plasmon Resonance* (SPR) parece uma alternativa, porém devemos obter o alvo com alto grau de pureza (Deng *et al.*, 2017).

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A metodologia permitiu o isolamento de um peptídeo ligante (EPI18) a superfície de epimastigotas, que foi comprovada de diferentes formas. Este peptídeo liga na faixa de nanomolar o qual é importante para ser utilizado em ensaios *in vivo*, além disso o peptídeo possui outras características interessantes como hidrosolubilidade, o que permite maior eficiência no momento da síntese.

Estes resultados promissores para este peptídeo nos motivam a testá-lo na forma recombinante, identificar o alvo, e realizar ensaios para avaliar eficiência de ligação, como por exemplo, *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Além disso, pretende-se avaliar a interferência desse peptídeo na interação parasito:inseto. Utilizando o peptídeo sintético ou fusionado com moléculas líticas para *T. cruzi* e avaliar o grau de colonização e/ou diferenciação no inseto vetor.

No *biopanning* utilizando a biblioteca L_{X15} encontramos uma maior variedade de peptídeos ligantes, apesar de não terem sido realizados experimentos validando sua capacidade de ligação, a análise de redundância de clones e de sequência (análises com MEME) estamos bastante seguros que encontraremos peptídeos com capacidade de ligação similar ou superior a EPI18. Os ensaios de ligação já padronizados neste trabalho permitirão uma rápida análise dos peptídeos mais frequentemente encontrados.

A avaliação da possibilidade de mimetismo molecular retornou uma lista de candidatos a interação parasito:hospedeiro, que apesar dos altos *E-values*, houve uma alta tendência em identificar as proteínas lipocalinas de triatomíneos como interatores. Essa possibilidade de interação precisa e será testada, provavelmente em ensaios de ligação e/ou competição com proteínas recombinantes.

Estes dados em conjunto, nos motiva a investir ainda mais nas estratégias de paratransgênese e em identificar peptídeos ligantes de formas infectivas presentes no hospedeiro mamífero.

9. REFERÊNCIAS

ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; PAIS, J. A. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.

AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; et al. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

ALVES, M. J. M.; KAWAHARA, R.; VINER, R.; et al. Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 182–192, 2017.

ARAUJO, P. F.; ALMEIDA, A. B.; PIMENTEL, C. F.; et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 437–446, 2017.

DE ARAÚJO, W. N.; VASCONCELOS, A. M. N.; DA NÓBREGA, A. A. Mortality Due to Chagas Disease in Brazil According to a Specific Cause. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 3, p. 528–533, 2014.

ARIAS, J. L.; UNCITI-BROCETA, J. D.; MACEIRA, J.; et al. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. **Journal of Controlled Release**, v. 197, p. 190–198, 2015.

BALCZUN, C.; SIEMANOWSKI, J.; PAUSCH, J. K.; et al. Intestinal aspartate proteases TiCatD and TiCatD2 of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Reduviidae): Sequence characterisation, expression pattern and characterisation of proteolytic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 4, p. 240–250, 2012.

BARAL, T. N.; MAGEZ, S.; STIJLEMANS, B.; et al. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. **Nature Medicine**, v. 12, n. 5, p. 580–584, 2006.

BARISÓN, M. J.; RAPADO, L. N.; MERINO, E. F.; et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964–8977, 2017.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 2003.

BARRY, M. A.; DOWER, W. J.; JOHNSTON, S. A. Toward cell-targeting gene therapy vectors: Selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. **Nature Medicine**, v. 2, n. 3, p. 299–305, 1996.

BARTHOLOMEU, D. C.; CERQUEIRA, G. C.; LEÃO, A. C. A.; et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3407–3417, 2009.

BAUSSAND, J.; DEREMBLE, C.; CARBONE, A. Periodic distributions of hydrophobic amino acids allows the definition of fundamental building blocks to align distantly related proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 67, n. 3, p. 695–708, 2007.

BEARD, C. B.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R. V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 123–141, 2002.

BERN, C. Chagas' Disease. (D. L. Longo, Org.) **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BONGIO, N. J.; LAMPE, D. J. Inhibition of *Plasmodium berghei* Development in Mosquitoes by Effector Proteins Secreted from *Asaia* sp. Bacteria Using a Novel Native Secretion Signal. (G. Favia, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143541, 2015.

BONNYCASTLE, L. L. C.; MEHROKE, J. S.; RASHED, M.; GONG, X.; SCOTT, J. K. Probing the Basis of Antibody Reactivity with a Panel of Constrained Peptide Libraries Displayed by Filamentous Phage. **Journal of Molecular Biology**, v. 258, n. 5, p. 747–762, 1996. Disponível em:

BORGES, E. C.; MACHADO, E. M. M.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: Effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 2, p. 130–133, 2006.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. (A. Debrabant, Org.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004792, 2016.

BRIONES, M. R.; EGIMA, C. M.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 70, n. 1–2, p. 9–17, 1995.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006.

BUSCHIAZZO, A.; AMAYA, M. F.; CREMONA, M. L.; FRASCH, A. C.; ALZARI, P. M. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 757–768, 2002.

CALJON, G.; CAVELIERS, V.; LAHOUTTE, T.; et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier:

Brain disposition of monovalent nanobodies. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2341–2353, 2012.

CALJON, G.; STIJLEMANS, B.; SAERENS, D.; et al. Affinity Is an Important Determinant of the Anti-*Trypanosome* Activity of Nanobodies. (J. M. Ndung'u, Org.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1902, 2012.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2016.

CHI, Y.-H.; HSIAO, J.-K.; LIN, M.-H.; et al. Lung Cancer-Targeting Peptides with Multi-subtype Indication for Combinational Drug Delivery and Molecular Imaging. **Theranostics**, v. 7, n. 6, p. 1612–1632, 2017.

CHO, W. L.; RAIKHEL, A. S. Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 30, p. 21823–21829, 1992.

COLCHER, D.; PAVLINKOVA, G.; BERESFORD, G.; et al. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. **The quarterly journal of nuclear medicine: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)**, v. 42, n. 4, p. 225–241, 1998.

CONTRERAS, V. T.; ARAÚJO-JORGE, T. C. DE; BONALDO, M. C.; et al. Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123–133, 1988.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.

CORDERO, E. M.; NAKAYASU, E. S.; GENTIL, L. G.; et al. Proteomic Analysis of Detergent-Solubilized Membrane Proteins from Insect-Developmental Forms of *Trypanosoma cruzi* [†]. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 7, p. 3642–3652, 2009.

CORREA, P. R. C.; CORDERO, E. M.; GENTIL, L. G.; BAYER-SANTOS, E.; SILVEIRA, J. F. DA. Genetic Structure and Expression of the Surface Glycoprotein GP82, the Main Adhesin of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

DA COSTA, V. G.; MARQUES-SILVA, A. C.; FLORIANO, V. G.; MORELI, M. L. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine: A meta-analysis of randomized trials. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 4885–4892, 2014.

CROSS, G. A. M.; TAKLE, G. B. The Surface Trans-Sialidase Family of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 385–411, 1993.

CRUZ, M. C.; SOUZA-MELO, N.; DA SILVA, C. V.; et al. *Trypanosoma cruzi*: Role of δ -Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. (I. Blader, Org.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51804, 2012.

CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SANCHEZ, D. O. gp63 Homologues in Trypanosoma cruzi: Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5739–5749, 2003.

DALLAGIOVANNA, B.; PLAZANET-MENUT, C.; OGATTA, S. F. Y.; et al. Trypanosoma cruzi: A Gene Family Encoding Chitin-Binding-like Proteins Is Posttranscriptionally Regulated during Metacyclogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 7–16, 2001.

DE GROEVE, K.; DESCHACHT, N.; DE KONINCK, C.; et al. Nanobodies as Tools for In Vivo Imaging of Specific Immune Cell Types. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 5, p. 782–789, 2010.

DE VOOGHT, L.; CALJON, G.; DE RIDDER, K.; VAN DEN ABBEELE, J. Delivery of a functional anti-trypanosome Nanobody in different tsetse fly tissues via a bacterial symbiont, Sodalis glossinidius. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.

DE VOOGHT, L.; CALJON, G.; STIJLEMANS, B.; et al. Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody® in Sodalis glossinidius, a bacterial symbiont of the tsetse fly. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 23, 2012.

DEFAUS, S.; GALLO, M.; ABENGÓZAR, M. A.; RIVAS, L.; ANDREU, D. A Synthetic Strategy for Conjugation of Paromomycin to Cell-Penetrating Tat(48-60) for Delivery and Visualization into Leishmania Parasites. **International Journal of Peptides**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

DENG, S.; WANG, P.; YU, X. Phase-Sensitive Surface Plasmon Resonance Sensors: Recent Progress and Future Prospects. **Sensors**, v. 17, n. 12, p. 2819, 2017.

DI NOIA, J. M.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. The protozoan Trypanosoma cruzi has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 41, p. 24146–24149, 1995.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. SciELO - Editora FIOCRUZ, 1997.

DOCAMPO, R.; LUKEŠ, J. Trypanosomes and the solution to a 50-year mitochondrial calcium mystery. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 31–37, 2012.

DOTSON, E. M.; BEARD, C. B. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. **Insect Molecular Biology**, v. 10, n. 3, p. 205–215, 2001.

DURVASULA, R. V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; et al. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3274–3278, 1997.

EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzin) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411–7420, 1992.

EBRAHIMIZADEH, W.; RAJABIBAZL, M. Bacteriophage Vehicles for Phage Display: Biology, Mechanism, and Application. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 109–120, 2014.

EL-SAYED, N. M. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.

FERRIÈRES, G.; VILLARD, S.; PUGNIÈRE, M.; et al. Affinity for the cognate monoclonal antibody of synthetic peptides derived from selection by phage display. Role of sequences flanking the binding motif. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 6, p. 1819–1829, 2000.

FIECK, A.; HURWITZ, I.; KANG, A. S.; DURVASULA, R. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 4, p. 342–347, 2010.

FIELD, M. C.; HORN, D.; FAIRLAMB, A. H.; et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 447–447, 2017.

DE FIGUEIREDO, R. C.; SOARES, M. J. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 5, p. 413–418, 2000.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C.; SANSOM, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1482, n. 1–2, p. 9–24, 2000. FOROUMADI, S.; RAJABIBAZL, M.; RAHIMPOUR, A.; et al. Production of human single-chain fragment antibody (ScFv) against human

epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) by phage display technology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, 2018.

FREITAS, L. M.; DOS SANTOS, S. L.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; et al. Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans- Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. (M. M. Rodrigues, Org.) **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25914, 2011.

FUENTES B, R.; MATURANA A, M.; DE LA CRUZ M, R. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. **Revista chilena de infectología**, v. 29, n. 1, p. 82–86, 2012.

FUKUTA, T.; ASAI, T.; KIYOKAWA, Y.; et al. Targeted delivery of anticancer drugs to tumor vessels by use of liposomes modified with a peptide identified by phage biopanning with human endothelial progenitor cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, n. 1–2, p. 364–372, 2017.

GANTZ, V. M.; JASINSKIENE, N.; TATARENKOVA, O.; et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 49, p. E6736–E6743, 2015.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 1, p. 11–21, 2007.

GHOSH, A. K.; RIBOLLA, P. E. M.; JACOBS-LORENA, M. Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13278–13281, 2001.

GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; et al. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3461–3468, 1999.

GOURBIÈRE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, n. 3, p. 190–202, 2012.

GRZYB, J.; LATOWSKI, D.; STRZAŁKA, K. Lipocalins – a family portrait. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 9, p. 895–915, 2006.

GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 406–424, 2017.

GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease: Parasite persistence in Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 673–685, 2009.

HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUGH, T.; MUYLDERMANS, S.; et al Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 446–448, 1993.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, 2006.

HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase. In: D. Walls; S. T. Loughran (Orgs.); **Protein Chromatography**. v. 681, p.259–280, 2011. Totowa, NJ: Humana Press.

HASSLOCHER-MORENO, A. M.; DO BRASIL, P. E. A. A.; DE SOUSA, A. S.; et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 2012.

HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J.; GIL, J.; LOZANO, L.; et al. Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*. **Journal of Proteomics**, v. 162, p. 30–39, 2017.

HOE, L.-N.; WAN, K.-L.; NATHAN, S. Construction and characterization of recombinant single-chain variable fragment antibodies against *Toxoplasma gondii* MIC2 protein. **Parasitology**, v. 131, n. 06, p. 759, 2005.

HOSKING, C. G.; MCWILLIAM, H. E. G.; DRIGUEZ, P.; et al. Generation of a Novel Bacteriophage Library Displaying scFv Antibody Fragments from the Natural Buffalo Host to Identify Antigens from Adult *Schistosoma japonicum* for Diagnostic Development. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004280, 2015.

HOU, L.; ZHU, D.; LIANG, Y.; et al. Identification of a specific peptide binding to colon cancer cells from a phage-displayed peptide library. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 1, p. 79–87, 2018.

HU, Y.; LIU, C.; MUYLDERMANS, S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

HUANG, J.; RU, B.; ZHU, P.; et al. MimoDB 2.0: a mimotope database and beyond. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D271–D277, 2012.

HURWITZ, I.; FIECK, A.; READ, A.; et al. Paratransgenic control of vector borne diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1334–1344, 2011a.

HURWITZ, I.; FIECK, A.; READ, A.; et al. Paratransgenic Control of Vector Borne Diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1334–1344, 2011b.

ISAACS, A. T.; JASINSKIENE, N.; TRETIAKOV, M.; et al. Transgenic Anopheles stephensi coexpressing single-chain antibodies resist Plasmodium falciparum development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. E1922–E1930, 2012.

JAMES, A. A.; BEERNTSEN, B. T.; CAPURRO, M. DE L.; et al. Controlling malaria transmission with genetically-engineered, Plasmodium-resistant mosquitoes: milestones in a model system. **Parassitologia**, v. 41, n. 1–3, p. 461–471, 1999.

JAZIN, E. E.; BONTEMPI, E. J.; SANCHEZ, D. O.; et al. Trypanosoma cruzi exoantigen is a member of a 160 kDa gene family. **Parasitology**, v. 110 (Pt 1), p. 61–69, 1995.

JOSE, C.; KLEIN, N.; WYSS, S.; et al. Recombinant *Arthrobacter* β -1, 3-glucanase as a potential effector molecule for paratransgenic control of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 65, 2013.

JURI AYUB, M.; NYAMBEGA, B.; SIMONETTI, L.; et al. Selective Blockade of Trypanosomatid Protein Synthesis by a Recombinant Antibody Anti-Trypanosoma cruzi P2 β Protein. (B. L. Kelly, Org.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36233, 2012.

JURI AYUB, M.; SMULSKI, C. R.; NYAMBEGA, B.; et al. Protein–protein interaction map of the Trypanosoma cruzi ribosomal P protein complex. **Gene**, v. 357, n. 2, p. 129–136, 2005.

KAHN, S.; COLBERT, T. G.; WALLACE, J. C.; HOAGLAND, N. A.; EISEN, H. The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of Trypanosoma cruzi is a family of sialidases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 10, p. 4481– 4485, 1991.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DE PAIVA, R. M. C.; ARAÚJO, P. R.; et al. Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 10, 2013.

KATO, H.; JOCHIM, R. C.; GOMEZ, E. A.; et al. Salivary gland transcripts of the kissing bug, *Panstrongylus chinai*, a vector of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 174, p. 122–129, 2017.

KHUSAL, K. G.; TONELLI, R. R.; MATTOS, E. C.; et al. Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for Trypanosoma cruzi into mammalian cells. **Parasitology Research**, v. 114, n. 1, p. 155–165, 2015.

KOLLIKER-FRERS, R. A.; INSUA, I.; RAZZITTE, G.; CAPANI, F. Chagas disease prevalence in pregnant women: migration and risk of congenital transmission. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 09, p. 895, 2016.

KULKARNI, M. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M.; MCGWIRE, B. S. Trypanosoma cruzi GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2193–2200, 2009.

LANDER, N.; LI, Z.-H.; NIYOGI, S.; DOCAMPO, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. **mBio**, v. 6, n. 4, p. e01012-15, 2015.

LARRALDE, O.; PETRIK, J. Phage-displayed peptides that mimic epitopes of hepatitis E virus capsid. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 206, n. 4, p. 301–309, 2017.

LI, C.; GAO, N.; XUE, Q.; et al. Screening and identification of a specific peptide binding to cervical cancer cells from a phage-displayed peptide library. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 10, p. 1463–1469, 2017.

LLEWELLYN, M. S.; MESSENGER, L. A.; LUQUETTI, A. O.; et al. Deep Sequencing of the *Trypanosoma cruzi* GP63 Surface Proteases Reveals Diversity and Diversifying Selection among Chronic and Congenital Chagas Disease Patients. (A. Jardim, Org.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003458, 2015.

LOW, H. P.; TARLETON, R. L. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily1Note: Nucleotide sequence data reported in this paper is available in the GenBank™ database under the accession number U77951.1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 88, n. 1–2, p. 137–149, 1997.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; DE LA TORRE, B. G.; HORNILLOS, V.; et al. Defeating *Leishmania* resistance to Miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: A proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 835–842, 2012.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016.

MAKHLUF, H.; SHRESTA, S. Development of Zika Virus Vaccines. **Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 7, 2018.

MALAGA, S.; YOSHIDA, N. Targeted Reduction in Expression of *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein gp90 Increases Parasite Infectivity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 353–359, 2001.

MANN, A. P.; SCODELLER, P.; HUSSAIN, S.; et al. Identification of a peptide recognizing cerebrovascular changes in mouse models of Alzheimer's disease. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

MANNA, P. T.; BOEHM, C.; LEUNG, K. F.; NATESAN, S. K.; FIELD, M. C. Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 251–258, 2014.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta- analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 2014.

MATSUMOTO, T. K.; COTRIM, P. C.; DA SILVEIRA, J. F.; STOLF, A. M. S.; UMEZAWA, E. S. Trypanosoma cruzi: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 42, n. 3, p. 187–192, 2002.

MCGUIRE, M. J.; LI, S.; BROWN, K. C. Biopanning of Phage Displayed Peptide Libraries for the Isolation of Cell-Specific Ligands. In: A. Rasooly; K. E. Herold (Orgs.); **Biosensors and Biodetection**. v. 504, p.291–321, 2009. Totowa, NJ: Humana Press.

MELLO, C. P.; LIMA, D. B.; MENEZES, R. R. P. P. B. DE; et al. Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in Bothrops atrox venom gland. **Toxicon**, v. 130, p. 56–62, 2017.

MESQUITA, R. D.; VIONETTE-AMARAL, R. J.; LOWENBERGER, C.; et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 2015.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 208–213, 2009.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MORILLO, C. A.; WASKIN, H.; SOSA-ESTANI, S.; et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MOUSAVIZADEH, A.; JABBARI, A.; AKRAMI, M.; BARDANIA, H. Cell targeting peptides as smart ligands for targeting of therapeutic or diagnostic agents: a systematic review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 507– 517, 2017.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 775–797, 2013.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRÄTZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; et al. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of Triatoma pallidipennis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 7, p. 5050– 5053, 1994.

NORMAN, F. F.; PÉREZ DE AYALA, A.; PÉREZ-MOLINA, J.-A.; et al. Neglected Tropical Diseases outside the Tropics. (K. E. Lyke, Org.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e762, 2010.

NORRIS, K. A.; BRADT, B.; COOPER, N. R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 147, n. 7, p. 2240–2247, 1991.

OGAUGWU, C. E.; DURVASULA, R. V. Developing the Arsenal Against Pest and Vector Dipterans: Inputs of Transgenic and Paratransgenic Biotechnologies. In: V. D. C. Shields (Org.); **Biological Control of Pest and Vector Insects**, 2017. InTech.

OKUDA, K.; ESTEVA, M.; SEGURA, E. L.; BIJOVSY, A. T. The Cytostome of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Is Associated with the Flagellar Complex.

Experimental Parasitology, v. 92, n. 4, p. 223–231, 1999.

OLIVERA, M. J.; FORY, J. A.; OLIVERA, A. J. Therapeutic drug monitoring of benznidazole and nifurtimox: a systematic review and quality assessment of published clinical practice guidelines. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 748–755, 2017.

OMS. Neglected tropical diseases. , 2018.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in *Trypanosomes*. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 127–151, 1987.

OPPERDOES, F. R.; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. **FEBS Letters**, v. 80, n. 2, p. 360–364, 1977.

DE PAIVA, R. M. C.; GRAZIELLE-SILVA, V.; CARDOSO, M. S.; et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. (S. M. Beverley, Org.) **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. e1005296, 2015.

PAPADOPOULOS, K. P.; ISAACS, R.; BILIC, S.; et al. Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 75, n. 5, p. 887–895, 2015.

PARUSSINI, F.; DUSCHAK, V. G.; CAZZULO, J. J. Membrane-bound cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)**, v. 44, n. 3, p. 513–519, 1998.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 3, p. 263–274, 2012.

PINAZO, M.-J.; MUNOZ, J.; POSADA, E.; et al. Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, 2010.

PITA, S.; PANZERA, F.; VELA, J.; et al. Complete mitochondrial genome of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), main vector of Chagas disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 158–163, 2017.
QIN, Z.; WANG, J.; WANG, Y.; et al. Identification of a Glypican-3-Binding Peptide for In Vivo Non-Invasive Human Hepatocellular Carcinoma Detection. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 4, p. 1600335, 2017.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; CAMPELO, I. S.; MORLIGHEM, J.-É. R. L.; MELO, L.M.; FREITAS, V. J. F. Cell-penetrating peptides (CPPs): From delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis. **Journal of Biotechnology**, v. 252, p. 15–26, 2017.

RAJA, Z.; ANDRÉ, S.; ABBASSI, F.; et al. Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. (S. Bhattacharjya, Org.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174024, 2017.

RATIER, L.; URRUTIA, M.; PARIS, G.; et al. Relevance of the Diversity among Members of the *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Family Analyzed with Camelids Single-Domain Antibodies. (J. Kazura, Org.) **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3524, 2008.

READ, L. K.; LUKEŠ, J.; HASHIMI, H. Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out: Trypanosome RNA editing. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 1, p. 33–51, 2016.

DOS REIS, F. C. G.; JÃ°DICE, W. A. S.; JULIANO, M. A.; et al. The substrate specificity of cruzipain 2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, n. 2, p. 215–220, 2006.

RIBEIRO, J. M.; WALKER, F. A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 6, p. 2251–2257, 1994.

RODRÍGUEZ-MORALES, O.; MONTEÓN-PADILLA, V.; CARRILLO-SÁNCHEZ, S. C.; et al. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

RUIZ-SANTAQUITERIA, M.; SÁNCHEZ-MURCIA, P. A.; TORO, M. A.; et al. First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent in vitro antileishmanial activity #. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 135, p. 49–59, 2017.

SAEED, A. F. U. H.; WANG, R.; LING, S.; WANG, S. Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

SALLES, B. C. S.; COSTA, L. E.; ALVES, P. T.; et al. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 3, p. 219–225, 2017.

SAMLI, K. N.; MCGUIRE, M. J.; NEWGARD, C. B.; JOHNSTON, S. A.; BROWN, K. C. Peptide-mediated targeting of the islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2103–2108, 2005.

SAMUELS, A. M.; CLARK, E. H.; GALDOS-CARDENAS, G.; et al. Epidemiology of and Impact of Insecticide Spraying on Chagas Disease in Communities in the Bolivian Chaco. (P. J. McCall, Org.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2358, 2013.

SANT'ANNA, C.; PEREIRA, M. G.; LEMGRUBER, L.; DE SOUZA, W.; CUNHA E SILVA, N. L. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 8, p. 599–605, 2008.

SANTOS, M. A.; GARG, N.; TARLETON, R. L. The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the trans-sialidase gene super-family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 1–11, 1997.

DOS SANTOS, S. L.; FREITAS, L. M.; LOBO, F. P.; et al. The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. (E. Dumonteil, Org.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1779, 2012.

SAYLOR, C.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. **Vaccine**, v. 27, p. G38–G46, 2009.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M. A.; HEISE, N.; et al. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 293–303, 1993.

SHORT, E. E.; CAMINADE, C.; THOMAS, B. N. Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 10, p. 117863361773229, 2017.

SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 77, n. 6, p. 461–468, 1991.
DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, n. 12, p. 1013–1025, 2002.

SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 89–100, 2009.

STIJLEMANS, B.; CALJON, G.; NATESAN, S. K. A.; et al. High Affinity Nanobodies against the *Trypanosoma brucei* VSG Are Potent Trypanolytic Agents that Block Endocytosis. (M. Parsons, Org.) **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 6, p. e1002072, 2011.

STIJLEMANS, B.; CONRATH, K.; CORTEZ-RETAMOZO, V.; et al. Efficient Targeting of Conserved Cryptic Epitopes of Infectious Agents by Single Domain Antibodies: AFRICAN TRYPANOSOMES AS PARADIGM. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 2, p. 1256–1261, 2004.

TEIXEIRA, A. A. R.; DE VASCONCELOS, V. DE 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. (B. A. Burleigh, Org.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004099, 2015.

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 271–282, 1986.

TONELLI, R. R.; GIORDANO, R. J.; BARBU, E. M.; et al. Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature In Vivo. (A. Rodriguez, Org.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e864, 2010.

TONELLI, R. R.; TORRECILHAS, A. C.; JACYSYN, J. F.; et al. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: The conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. **Parasitology**, v. 138, n. 04, p. 481–492, 2011.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

UMEKITA, L. F.; CARNEIRO, S. M.; SESSO, A.; MOTA, I. One fate of bloodstream trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* after immune clearance: an ultrastructural study. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 867–872, 1999.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 2, p. 157–163, 2009.

WANG, S.; DOS-SANTOS, A. L. A.; HUANG, W.; et al. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1399–1402, 2017.

WANG, S.; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 185–193, 2013.

WATTERS, J. M.; TELLEMAN, P.; JUNGHANS, R. P. An optimized method for cell-based phage display panning. **Immunotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21–29, 1997.

WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F.; CHAMPAGNE, D. E.; WALKER, F. A.; MONTFORT, W. R. Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 4, p. 304–309, 1998.

WILKINSON, S. R.; BOT, C.; KELLY, J. M.; HALL, B. S. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, 2009.

WU, C.-H.; LIU, I.-J.; LU, R.-M.; WU, H.-C. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, 2016.

YOSHIDA, N.; TYLER, K. M.; LLEWELLYN, M. S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 459–466, 2011.

ZEIBIG, E. **Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínica- laboratorial**. Elsevier Brasil, 2014.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

10. ANEXOS

ANEXO 1. BLAST da sequência dos clones identificados no *biopanning* com a biblioteca L_{X15}, a busca foi feita em base de dados de *Homo sapiens*, consideram-se as sequências com os critérios estabelecidos no texto.

Peptídeo	Descrição da sequência encontrada no banco de dados usando a ferramenta BlastP	Cobertura	E valu e	Identificador
HGK-1	Não foram encontradas sequências que cumpram os critérios.			
GGK-1	coagulation factor VIII [Homo sapiens]	46%	34	ABJ51923.1
YHQ-1	Myotubularin related protein-3	53%	0.53	AAB88872.1
	Myotubularin related protein-3 isoform CRA b	53%	0.53	EAW59850.1
	Myotubularin related protein-3 isoform CRAa	53%	0.53	EAW59849.1
	free fatty acid receptor 2 [Homo sapiens]	60%	2.2	NP_005297.1
	FFAR2 protein [Homo sapiens]	60%	2.2	AAH95535.1
	Free fatty acid receptor 2 [Homo sapiens]	60%	2.2	AAH96201.1
LPP-1	Não foram encontradas sequências que cumpram os critérios.			
MSR-1	titin [Homo sapiens]	73%	4.3	CAA45938.1
	titin [Homo sapiens]	73%	4.3	CAA49245.1
	titin [Homo sapiens]	80%	4.3	CAA62188.1
	integrin, beta 4, isoform CRA_d [Homo sapiens]	93%	8.7	EAW89309.1
SPM-1	Não foram encontradas sequências que cumpram os critérios.			
RPE-1	PREDICTED: transmembrane channel-like protein 6 isoform X6 [Homo sapiens]	53%	6.1	XP_011522560.1
	transmembrane channel-like 6, isoform CRA_c [Homo	53%	6.1	EAW8949

	sapiens]			2.1
	transmembrane channel-like protein 6 [Homo sapiens]	53%	6.2	AAP69874 .1
QVS-1	Não foram encontradas sequências que cumpram os critérios.			
PCD-1	IL2-inducible T-cell kinase variant [Homo sapiens]	60%	6.1	BAD92859 .1
	tyrosine-protein kinase ITK/TSK [Homo sapiens]	60%	6.1	NP_00553 7.3
	EMT [Homo sapiens]	60%	6.1	AAB28072 .2
	MTAPMPVPDNPGRSGS			
	T-cell delta-catenin [Homo sapiens]	86%	1.1	ACA13456 .1
	catenin delta-2 isoform 1 [Homo sapiens]	86%	1.1	NP_00132 3.1
	delta-catenin [Homo sapiens]	86%	1.1	AAC63103 .1
	OSBPL1A protein [Homo sapiens]	86%	8.7	AAH73854 .1
	oxysterol-binding protein-like protein OSBPL1B [Homo sapiens]	86%	8.7	AAL40663 .1
HTR-1	Não foram encontradas sequências que cumpram os critérios.			
SNL-1	gastric triacylglycerol lipase isoform 3 precursor [Homo sapiens]	66%	1.5	NP_00118 5757.1
	Chain A, Crystal Structure Of Human Gastric Lipase	66%	1.5	1HLG_A
	gastric triacylglycerol lipase isoform 4 precursor [Homo sapiens]	66%	1.5	NP_00118 5759.1
	Lipase, gastric [Homo sapiens]	66%	1.5	AAI12273. 1
RMI-1	Não foram encontradas sequências que cumpram os critérios.			