

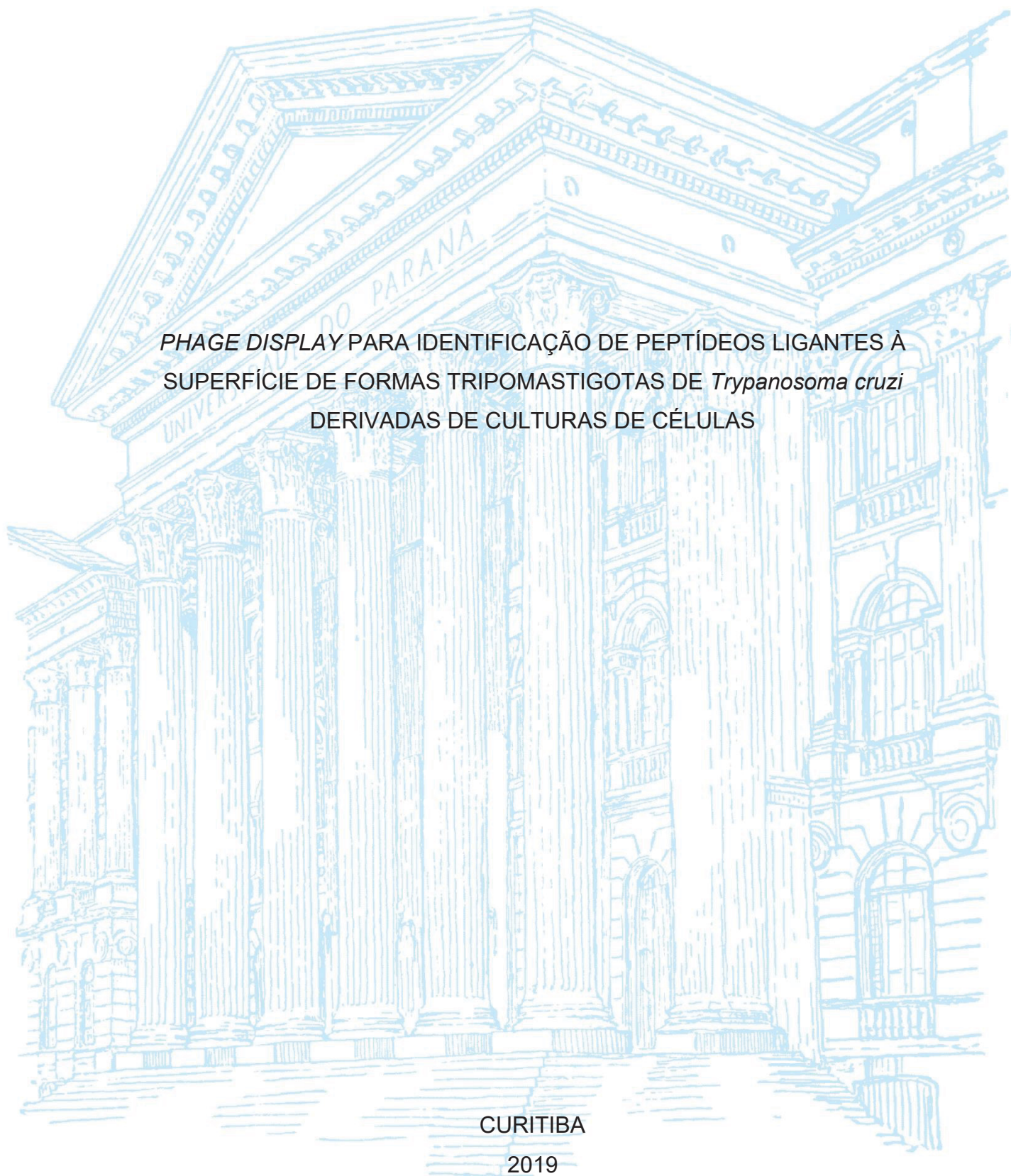
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA SEVERO MIRANDA

*PHAGE DISPLAY* PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES À  
SUPERFÍCIE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*  
DERIVADAS DE CULTURAS DE CÉLULAS

CURITIBA

2019



JULIANA SEVERO MIRANDA

*PHAGE DISPLAY* PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES À  
SUPERFÍCIE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*  
DERIVADAS DE CULTURAS DE CÉLULAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha  
Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Miranda, Juliana Severo

*Phage display* para identificação de peptídeos ligantes à superfície de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivadas de culturas de células. / Juliana Severo Miranda. – Curitiba, 2019.

115 p.: il.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha.

Coorientadora: Juliana Ferreira de Moura.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Tripanossoma cruzi. 2. Peptídeos. 3. Biblioteca de peptídeos. I. Título. II. Rocha, Wanderson Duarte da. III. Moura, Juliana Ferreira de, 1975-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 614.533




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

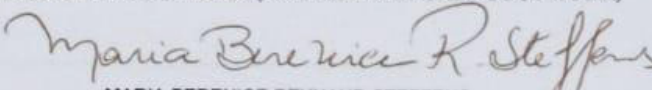
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JULIANA SEVERO MIRANDA intitulada: **Phage display para identificação de peptídeos ligantes a superfície de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivadas de cultura de células**, sob orientação do Prof. Dr. WANDERSON DUARTE DA ROCHA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Dezembro de 2019.

  
WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu irmão, por serem sempre a força que me impulsiona a ir mais além.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me mantido no meu objetivo e por me fazer perceber, no meio a imensa saudade de casa, que eu poderia ser alguém melhor todos os dias. E por colocado no meu caminho pessoas maravilhosas que contribuíram para que essa jornada fosse um pouco mais fácil.

Ao meu orientador, que permitiu que eu fizesse parte do grupo GFP e permitiu, com o meu projeto, que eu visse como a ciência pode ser mais interessante do que eu pensava. Além disso, obrigada pela cordialidade desde os nossos primeiros contatos e por nunca ter ficado louco no laboratório, mesmo quando a gente merecia.

À minha mãe, por ser minha melhor amiga sempre e por me fazer sentir que está ao meu lado todos os dias, mesmo estando distante. Por se sacrificar para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

Ao meu pai, que sempre me incentivou a buscar oportunidades para meu crescimento pessoal. Obrigada por sempre torcer por mim.

Ao meu irmão, que sempre foi um exemplo de pessoa que devo seguir (vou me arrepender de dizer isso) e por me ajudar sempre. Obrigada por tudo que faz por mim e por comemorar as minhas conquistas como se fossem suas.

À professora Dra Juliana Ferreira de Moura, que sempre nos acolheu quando precisávamos, assim como obrigada a todo o laboratório de Imunoquímica pelos serviços e conselhos prestados.

Agradeço também a todas as pessoas do laboratório GFP pela companhia e auxílio sempre. Agradeço em especial ao José, que esteve ao meu lado sempre para me socorrer e por tentar me mostrar que meu desespero, na maioria das vezes, era desnecessário. Obrigada pelos cafés, almoços, por me ouvir chorar, pela companhia até tarde (ou até muito cedo) em muitos dias no laboratório e pela implicância de sempre que me faz sorrir todos os dias.

Irineu, obrigada por estar ao meu lado nos momentos felizes e naqueles não tão bons assim. Por fazer piada dos momentos desastrosos e que fazia eu me sentir sempre melhor. Agradeço pela companhia tanto na UFPR quanto fora dela:

shoppings, mercados, parques, e outras situações que não se contam nos agradecimentos de uma dissertação.

Lucas Oliveira, obrigada por sempre me ajudar com as minhas imagens e por acreditar em mim mais que eu mesma. Você é um amigão e um ótimo designer!

Não menos importante, à minha sobrinha de quatro patas linda de morrer, que com sua fofura que derrete sempre meu coração, me acalmava em meio a toda essa correria.

A todas as pessoas, funcionários da UFPR e laboratórios que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento do meu projeto.

Agradeço a todas as pessoas que passaram nesses últimos anos na minha vida e que contribuíram para que eu não estivesse sozinha.

A todos os meus amigos, pelos momentos inesquecíveis.

“Às vezes a vida é dura, mas eu tenho muita coisa para  
agradecer.

(...) E não devemos nunca, NUNCA, nos esquecer das  
pessoas que amamos”.

A cabana - William P. Young

## RESUMO

A tripanossomíase americana, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é de caráter crônico e progressivo. Até o momento, não há vacinas ou medicações eficazes para a cura da enfermidade. A superfície do parasito apresenta um repertório diversificado de moléculas que podem ser utilizadas como alvo por moléculas ligantes conjugadas com fármacos para desenvolver novas terapias antichagásicas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar peptídeos que interagem com a superfície de formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular (TCT) através da técnica de *Phage display*, utilizando uma biblioteca de peptídeos denominada X15. Para o processo de seleção, quatro rounds de *biopanning* foram feitos. Clones de bacteriófagos selecionados foram sequenciados e submetidos a análise de BLASTp utilizando dados de proteoma humano. As sequências apresentaram homologia com proteínas dos hospedeiros mamíferos, principalmente com as imunoglobulinas. Nossos resultados sugerem que esses peptídeos identificados podem mimetizar possíveis interações parasito-hospedeiro. A capacidade de ligação dos fagos selecionados foi avaliada pelo teste de ELISA, sendo que 6 clones mostraram fortes interações com o parasito. O peptídeo de maior reatividade, denominado T2, foi sintetizado e testado em ensaios de invasão e ensaios de viabilidade. Os resultados mostram que o peptídeo prejudicou a capacidade das formas tripomastigotas de invadir monocamadas celulares em todas as concentrações utilizadas, indicando que o peptídeo pode interagir com sítios importantes para o processo de infecção do parasito. Por outro lado, o peptídeo não demonstrou toxicidade para os parasitos e para as células hospedeiras (LLC-MK2). Os resultados descritos aqui reforçam nossa ideia de que alvejar a superfície de TCTs pode constituir uma boa estratégia para prejudicar o processo de infecção do parasito e para o desenvolvimento de moléculas terapêuticas alternativas.

PALAVRAS CHAVE: *Biopanning*, Peptídeos ligantes, *Phage display*, *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

American trypanosomiasis is caused by *Trypanosoma cruzi*, showing a chronic and progressive stage. Until now, there is no vaccine or effective medications to cure this disease. The parasite surface shows a diverse repertoire of molecules that can be used as target by ligand molecules conjugated with drugs to develop new antichagasic therapies. Thus, main goal of the present work is to identify peptides that interact with the surface of tissue-culture derived trypomastigotes (TCT) through the Phage display technique using a peptide library named X15. For the selection process, four rounds of biopanning were performed. Selected bacteriophage clones were sequenced and subjected to BLASTp analysis against human proteome data. The sequences showed homology to mammalian host proteins, mainly to immunoglobulins. Our results suggest that these identified peptides may mimic possible parasite-host interactions. The binding capacity of the selected phages were validated by ELISA, where 6 clones showed strong interactions with the parasite. The most reactive peptide, named T2, was synthesized and tested in invasion assays and viability assays. The results show that the peptide impaired the ability of trypomastigotes forms to invade cell monolayers in all tested concentrations, indicating that the peptide may interact with sites important for the parasite infection process. On the other hand, the peptide showed no toxicity to the parasites or host cells (LLC-MK2 cells). The results described here reinforces our idea that targeting TCT surface can be a good strategy to impair parasite infection, and can be used to develop alternative therapeutic molecules.

KEYWORDS: Biopanning, Binding peptides, Phage display, *Trypanosoma cruzi*

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> O curso da Doença de Chagas. ....  | 17 |
| <b>Figura 2:</b> <i>T. cruzi</i> apresenta diversas proteínas de superfície que interagem com o respectivo hospedeiro. ....   | 20 |
| <b>Figura 3:</b> Representação do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> . ....   | 22 |
| <b>Figura 4:</b> Bacteriófagos filamentosos são modificados geneticamente para expressar peptídeos fusionados a proteínas do capsídeo viral. ....                             | 29 |
| <b>Figura 5:</b> Representação das etapas realizadas para cada ciclo do processo de <i>biopanning</i> . ....  | 38 |
| <b>Figura 6:</b> Esquematização do processo de titulação dos bacteriófagos. ....  | 40 |
| <b>Figura 7:</b> Eficiência de recuperação dos clones de bacteriófagos ligantes a superfície de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após quatro rounds de seleção. .... | 45 |
| <b>Figura 8:</b> Predição da estrutura 3D das proteínas humanas mimetizadas pelos peptídeos selecionados. ....  | 50 |
| <b>Figura 9:</b> Domínios conservados entre os peptídeos selecionados. ....   | 52 |
| <b>Figura 10:</b> Representação dos domínios encontrados. ....  | 52 |
| <b>Figura 11:</b> Avaliação da capacidade de ligação dos clones selecionados através do Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA). ....                                      | 53 |
| <b>Figura 12:</b> Ensaio de bloqueio de infecção utilizando os clones de bacteriófagos selecionados. ....   | 54 |
| <b>Figura 13:</b> Ensaio de bloqueio de infecção utilizando o clone de bacteriófago T2. ....  | 55 |
| <b>Figura 14:</b> Ensaio de bloqueio de infecção utilizando o peptídeo sintético T2. ....   | 57 |
| <b>Figura 15:</b> Padrão de infecção de células LLC-MK2 em ensaios de bloqueio de infecção utilizando o peptídeo sintético T2. ....   | 58 |
| <b>Figura 16:</b> Ensaio de bloqueio de infecção em células LLC-MK2 utilizando o peptídeo sintético T2. ....  | 61 |
| <b>Figura 17:</b> Ensaio de viabilidade em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....   | 63 |
| <b>Figura 18:</b> Ensaio de viabilidade em células da linhagem LLC-MK2. ....  | 63 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Iniciadores e condições utilizadas para a realização da PCR.....   | 41 |
| <b>Tabela 2:</b> Porcentagem de formas tripomastigotas utilizadas em cada ciclo de <i>biopanning</i> .....                | 44 |
| <b>Tabela 3:</b> Frequência e porcentagem apresentada pelos peptídeos selecionados após o processo de sequenciamento..... | 46 |
| <b>Tabela 4:</b> Parâmetros fornecidos pela ferramenta de bioinformática BLASTp.....                                      | 48 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1:</b> Possíveis proteínas humanas que mimetizam a interação dos peptídeos selecionados com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> ..... | 47 |
|---|----|

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

| Sigla                         | Correspondência  |
|-------------------------------|--|
| BSA                           | Soro albumina bovina (do inglês, <i>bovine serum albumin</i> )   |
| BLAST                         | Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (do inglês, <i>Basic local alignment search tool</i> ) |
| DAPI                          | 4',6'-diamino-2-fenil-indol (do inglês, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> )                         |
| DEAE-celulose                 | Dietilaminoetil celulose   |
| DMSO                          | Dimetilsulfóxido   |
| ELISA                         | Ensaio de imunoadsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )              |
| g                             | Aceleração da gravidade  |
| H                             | Hora (s)   |
| HCl                           | Ácido clorídrico   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio   |
| LA                            | Luria bertani ágar   |
| LB                            | Luria bertani  |
| LIT                           | Infusão de fígado e triptose (do inglês, <i>Liver infusion triptose</i> )                              |
| LLC-MK2                       | Célula epitelial de rim de macaco Rhesus   |
| M                             | Molar  |
| MEME                          | Multiple EM for Motif Elicitation  |
| mg                            | Miligrama  |
| mM                            | Milimolar  |
| Min                           | Minuto(s)  |
| mL                            | Mililitro  |
| N                             | Normal/normalidade   |
| NaCl                          | Cloreto de sódio   |
| NM                            | Nanômetro  |

|         |  |
|---------|--|
| OPD     | O-Fenilenodiamina dihidroclorato (do inglês, <i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> )         |
| PBS     | Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i> )                             |
| PCR     | Reação da polimerase em cadeia (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )                    |
| PEG     | Polietilenoglicol  |
| RPM     | Rotações por minuto  |
| RPMI    | Roswell Park Memorial Institute  |
| RT      | Temperatura ambiente (do inglês, <i>room temperature</i> )                                       |
| SFB     | Soro fetal bovino  |
| TAU     | Urina artificial de triatomíneo (do inglês, <i>Triatomine artificial urine</i> )                 |
| TAU3AAG | Meio TAU suplementado com glicose e aminoácidos  |
| TBS     | Solução salina tris tamponada (do inglês, <i>Tris-buffered saline</i> )                          |
| TCT     | Tripomastigotas derivados de cultivo celular (do inglês, <i>Tissue culture trypomastigotes</i> ) |
| TU      | Unidades de transdução (do inglês, <i>Units transducing</i> )                                    |
| VSG     | Glicoproteínas variantes de superfície (do inglês, <i>variant surface glycoprotein</i> )         |
| µg      | Micrograma   |
| µL      | Microlitro   |
| °C      | Graus celsius  |

---

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 15 |
| 2.1. A DOENÇA DE CHAGAS.....   | 15 |
| 2.1.1. Aspectos gerais.....  | 15 |
| 2.1.2. Formas de transmissão .....   | 16 |
| 2.1.3. O parasito.....   | 18 |
| 2.1.4. Proteínas de superfície do <i>T. cruzi</i> .....                                      | 19 |
| 2.1.5. O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....  | 20 |
| 2.1.6. Mecanismos de evasão do sistema imune e de sobrevivência do <i>T. cruzi</i> .....     | 23 |
| 2.1.7. Tratamento .....  | 24 |
| 2.2. A BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS ALTERNATIVAS ..... | 25 |
| 2.2.1. Estratégias alternativas para alvejar patógenos: scFv e nanobodies.....               | 27 |
| 2.2.2. Utilização da técnica de <i>Phage display</i> para identificação de ligantes .....    | 29 |
| 3. JUSTIFICATIVA .....   | 31 |
| 4. OBJETIVOS .....   | 32 |
| 4.1. OBJETIVO GERAL .....  | 32 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 32 |
| 5. METODOLOGIA.....  | 33 |
| 5.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS .....                                      | 35 |
| 5.2. OBTENÇÃO DOS PARASITOS .....  | 35 |
| 5.2.1. Manutenção dos parasitos e condições de cultivo .....                                 | 35 |
| 5.2.2. Metaciclogênese .....   | 35 |
| 5.2.3. Obtenção das formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular (TCT) .....          | 36 |
| 5.3. SELEÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS PEPTÍDEOS LIGANTES .....                                    | 36 |
| 5.3.1. <i>Biopanning</i> .....   | 36 |
| 5.3.2. Amplificação e purificação dos bacteriófagos.....                                     | 38 |
| 5.3.3. Titulação dos bacteriófagos.....  | 39 |
| 5.4. PCR E SEQUENCIAMENTO .....  | 40 |
| 5.5. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA .....   | 41 |
| 5.6. CONFIRMAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS .....                                    | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 5.7. ENSAIO DE BLOQUEIO DE INFECÇÃO .....   | 42 |
| 5.8. ENSAIO DE VIABILIDADE <i>IN VITRO</i> .....  | 43 |
| 5.9. EXPERIMENTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 43 |
| 6. RESULTADOS .....   | 44 |
| 6.1. SELEÇÃO DE CLONES QUE INTERAGEM COM A SUPERFÍCIE DE FORMAS<br>TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> ..... | 44 |
| 6.2. IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LIGANTES E ANÁLISES DE<br>BIOINFORMÁTICA .....                             | 45 |
| 6.2.1. Determinação da sequência dos peptídeos selecionados e identificação de<br>proteínas miméticas ..... | 45 |
| 6.2.2. Localização das sequências peptídicas selecionadas nas proteínas preditas..                          | 49 |
| 6.2.3. Determinação de domínios conservados entre os peptídeos selecionados ....                            | 51 |
| 6.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS CLONES<br>SELECIONADOS.....                                     | 53 |
| 6.4. ENSAIO DE BLOQUEIO DE INFECÇÃO .....   | 54 |
| 6.5. ENSAIO DE VIABILIDADE <i>IN VITRO</i> .....  | 61 |
| 7. DISCUSSÃO .....  | 64 |
| 8. CONCLUSÕES .....   | 74 |
| 9. PERSPECTIVAS.....  | 75 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 77 |

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), aproximadamente 6-7 milhões de pessoas estão infectadas com o parasito e cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão. Apesar da doença ter sido descoberta há mais de um século, essa enfermidade ainda é extremamente prevalente, principalmente em 21 países latino-americanos onde a doença é endêmica, o que faz com que a Doença de Chagas constitua um grave problema de saúde pública (PINHEIRO et al., 2017). Ainda que a tripanossomíase americana seja endêmica na América Latina, a migração de pessoas infectadas tem contribuído para a expansão da doença para outros continentes, em locais onde a transmissão vetorial não era encontrada, de forma que essa infecção parasitária tem se tornado um problema de saúde global (MACLEAN et al., 2018; PAROLI et al., 2018).

A população infectada pelo *T. cruzi* geralmente se encontra nas classes socioeconômicas mais baixas de seus respectivos países. Levando em consideração que os sintomas clínicos são crônicos e progressivos, os cuidados com a saúde podem ser muito caros, acumulando custos ao longo dos anos. Tal realidade faz com que a doença de Chagas seja considerada a doença negligenciada de maior impacto socioeconômico na América Latina devido à perda de produtividade causada por invalidez ou mortalidade precoce das pessoas infectadas, o que causa sérias consequências à saúde pública e para a economia nacional (CUCUNUBÁ et al., 2017, 2016; LEE et al., 2013; MUCCI et al., 2017).

Uma vez que não há vacina contra o parasito e tendo em vista que os tratamentos atualmente existentes para a doença apresentam muitos efeitos colaterais aos pacientes e possuem eficácia variável, o desenvolvimento de novas terapias constitui uma necessidade urgente (CAI et al., 2016).

A heterogeneidade antigênica encontrada na superfície do *T. cruzi* é essencial para a adaptação e sobrevivência do parasito durante o seu ciclo de vida (PECH-CANUL et al., 2017). Assim, as proteínas de superfície constituem alvos potenciais de estudo para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento dos pacientes e para prevenção da infecção.

Nesse contexto, a técnica de *Phage display* se mostra de fácil realização e de baixo custo para a identificação de ligantes que podem auxiliar no estudo de interação patógeno-hospedeiro. A abordagem também pode ser utilizada para outras aplicações, como o desenvolvimento de novas terapias baseadas na conjugação de fármacos a peptídeos que possam ser internalizados pelo patógeno, assim como para a elaboração de vacinas e novos métodos de diagnóstico (EBRAHIMIZADEH e RAJABIBAZL, 2014).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. A DOENÇA DE CHAGAS**

#### **2.1.1. Aspectos gerais**

Descrita em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), a tripanossomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas, é uma zoonose causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* e é considerada pela Organização Mundial da Saúde (WHO) como uma doença tropical negligenciada.

A doença se apresenta em duas fases distintas, sendo uma fase aguda estabelecida inicialmente após a contaminação e uma fase crônica que é mantida ao longo da vida do hospedeiro infectado. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e, na maioria dos casos, se apresenta de forma assintomática. Porém, alguns sinais relacionados com o local da introdução do parasito, como o sinal de romaña, que corresponde a um edema indolor geralmente bipalpebral e unilateral, assim como o chagoma de inoculação, um nódulo subcutâneo arredondado, podem estar presentes nessa fase, além de outros sinais sistêmicos inespecíficos como febre, mal-estar e linfadenopatia. Geralmente esses sinais desaparecem após algumas semanas, mas a sintomatologia pode se agravar, sendo que miocardite e meningoencefalite resultam na pequena parcela de mortes que ocorrem durante esse período (LIDANI et al., 2017; PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2017).

Por outro lado, a fase crônica é caracterizada pela redução/ausência da parasitemia e pode se apresentar em três formas principais: indeterminada, cardíaca e digestiva. Na forma indeterminada, como ocorre em aproximadamente 60-70 % dos casos, o paciente não desenvolve sintomas clínicos e pode permanecer dessa

maneira durante toda a vida, os exames cardíacos e radiológicos se mostram normais, mas há sorologia positiva (ÁLVAREZ-HERNANDEZ et al., 2018).

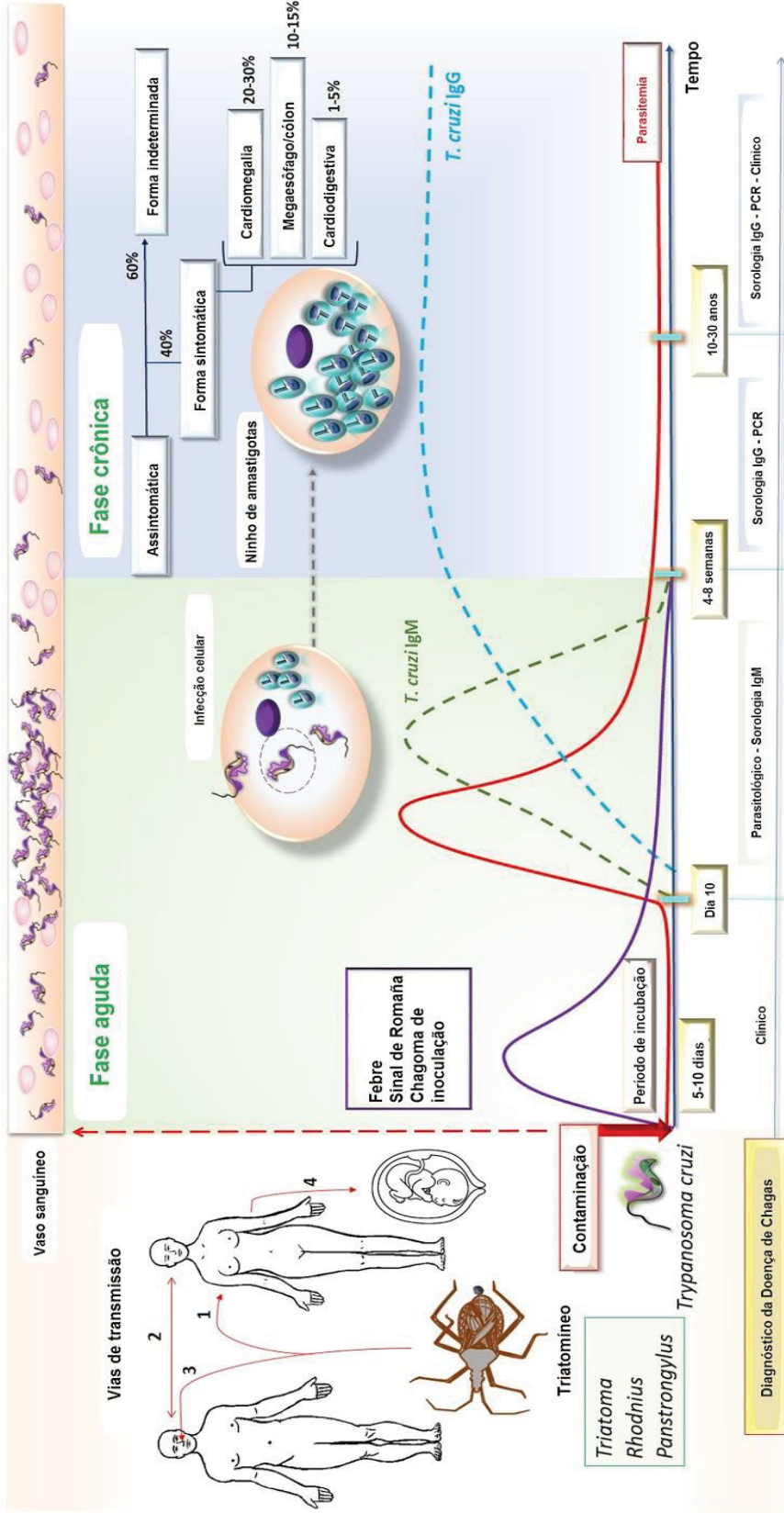
A forma cardíaca é a principal causa de morte pela doença, havendo hipertrofia do músculo cardíaco (cardiomegalia) que provoca distúrbios como arritmias e outras alterações no sistema de condução cardíaco e, em casos mais graves, insuficiência cardíaca e morte súbita. Na forma digestiva podem ocorrer alterações na motilidade esofágica (megaesôfago) e do cólon (megacólon) em virtude da denervação do sistema nervoso autônomo, que leva à redução ou perda da peristalse. Ainda que as formas existentes na fase crônica sejam descritas separadamente, uma combinação das formas cardíacas e digestivas também pode ocorrer (BERMUDEZ et al., 2016; DURAN-REHBEIN et al., 2014; SIMÕES-SILVA et al., 2017).

### **2.1.2. Formas de transmissão**

Os humanos podem se infectar através do contato com fezes e urina contaminadas (contendo formas tripomastigotas metacíclicas) que são liberadas durante o repasto sanguíneo de insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros. Os triatomíneos, além de um ciclo silvestre, passaram a apresentar ciclos peridomiciliares e domiciliares ao encontrarem condições de sobrevivência nas habitações humanas quando o homem passou a invadir o habitat inicial do vetor e começou a alterar o ambiente por meio de desmatamentos e queimadas (COURA, 2015; KLOTZ et al., 2014; VIEIRA et al., 2018).

O controle vetorial foi adotado em muitas localidades endêmicas, mas outras formas de transmissão não vetoriais podem ocorrer, como a via oral devido à ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com fezes de triatomíneos, assim como pela presença de sangue de outros mamíferos contaminados que podem ser utilizados na alimentação. A transmissão materna, assim como transfusões de sangue e transplante de órgãos contaminados sustentam a infecção, ainda que práticas de controle nos bancos de sangue contribuam para a redução da transmissão transfusional (GONZALEZ-ORTIZ et al., 2019; HOTEZ et al., 2016; ZINGALES et al., 2014). Mais recentemente, a transmissão por via sexual também foi demonstrada (ARAÚJO et al., 2017; GOMES et al., 2019).

De maneira geral, o curso da doença de Chagas pode ser representado como mostrado na figura 1:



**Figura 1:** O curso da Doença de Chagas.

As principais formas de transmissão do *T. cruzi* podem ocorrer por (1) via vetorial (2) transfusão de sangue ou transplante de órgãos, (3) via oral ou (4) via congênita. Após um período de incubação, segue-se a fase aguda da doença, caracterizada pela alta parasitemia de formas tripomastigotas. Anticorpos IgM anti-*T. cruzi* também podem ser encontrados nessa fase. Além disso, as pessoas infectadas, quando sintomáticas, apresentam sintomas inespecíficos. Geralmente após 4-8 semanas, a fase crônica se estabelece, havendo uma redução na parasitemia, e o diagnóstico passa a ser baseado na detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* ou por testes moleculares. Nesta fase, a maioria das pessoas infectadas entra em uma forma assintomática prolongada, conhecida como forma indeterminada. No entanto, cerca de 30 a 40% das pessoas infectadas poderão apresentar algumas manifestações clínicas, geralmente cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas.

**Fonte:** Imagem adaptada de Lidani et al. (2017).

### 2.1.3. O parasito

*T. cruzi* é uma espécie de parasito protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O parasito apresenta um único flagelo e uma mitocôndria única alongada e ramificada contendo uma região denominada cinetoplasto, que armazena o DNA mitocondrial (kDNA) (BAKER et al., 2015; DEWAR et al., 2018; MESSENGER et al., 2015).

Devido à elevada diversidade genética e fenotípica observada no protozoário, foram propostos seis grupos genéticos ou Unidades de Tipagem Discretas (DTUs), denominadas por TcI-TcVI. Mais recentemente foi proposta a sétima DTU, Tcbat, identificada inicialmente em morcegos, mas já encontrada em humanos, sendo que várias DTUs podem coexistir no mesmo hospedeiro (BALOUZ et al., 2017; BRENIÈRE et al., 2016).

A variabilidade presente em diferentes isolados de *T. cruzi* contribui para o estabelecimento do curso clínico da doença de Chagas, tendo em vista que determina fatores como a capacidade de invasão na célula hospedeira, taxa de crescimento intracelular, evasão do sistema imunológico, tropismo por determinados tecidos do hospedeiro e sensibilidade às medicações antichagásicas (ALESSIO et al., 2017, 2018; DARIO et al., 2016).

Dentre os tripanossomatídeos sequenciados até o momento, o *T. cruzi* é o que apresenta o maior conteúdo gênico, definido pela presença de genes agrupados em famílias multigênicas e pela grande quantidade de sequências repetitivas. A grande diversidade de proteínas encontradas na superfície de *T. cruzi* tem um importante papel na interação que o parasito estabelece com o hospedeiro, e essa variação observada nas características biológicas individuais, como infectividade, é em parte determinada pelas proteínas que o parasito expressa em determinado momento. Durante o complexo ciclo de vida, várias alterações morfológicas ocorrem e são acompanhadas por alterações na expressão das proteínas de superfície, que permitem a adaptação e sobrevivência do protozoário no hospedeiro, além de dificultarem o desenvolvimento de medicações e vacinas (EICKHOFF et al., 2016; PABLOS e OSUNA, 2012; PECH-CANUL et al., 2017).

#### 2.1.4. Proteínas de superfície do *T. cruzi*

Ao se considerar as proteínas mais relevantes durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, encontram-se as mucinas, que são as glicoproteínas mais abundantes na superfície do parasito. A região proteica das mucinas apresenta grande quantidade de resíduos de treonina e serina, que são sítios de O-glicosilação de oligossacarídeos compostos por galactoses terminais e N-acetilglicosamina. Essas glicoproteínas estão envolvidas em processos de adesão celular e também na evasão do sistema imunológico do hospedeiro, como será relatado posteriormente (BUSCAGLIA et al., 2006; ROWE et al., 2017).

Outras proteínas importantes são as transialidases, que correspondem à maior família gênica encontrada no parasito, estão associadas a membrana plasmática do protozoário por âncoras de GPI e apresentam duas regiões principais: a região N-terminal, que contém o domínio catalítico da enzima, e a região C-terminal, composta por repetições de 12 aminoácidos denominadas de SAPA (Shed Acute Phase Antigen). As transialidases são divididas em grupos, sendo que no grupo I encontram-se enzimas capazes de transferir ácido siálico do hospedeiro para as mucinas de superfície do parasito, o que confere carga negativa ao protozoário e protege os tripomastigotas do reconhecimento pelos anticorpos, com consequente evasão da resposta humoral do hospedeiro (LANTOS et al., 2016; WILBRINK et al., 2014; YOSHIDA, 2006).

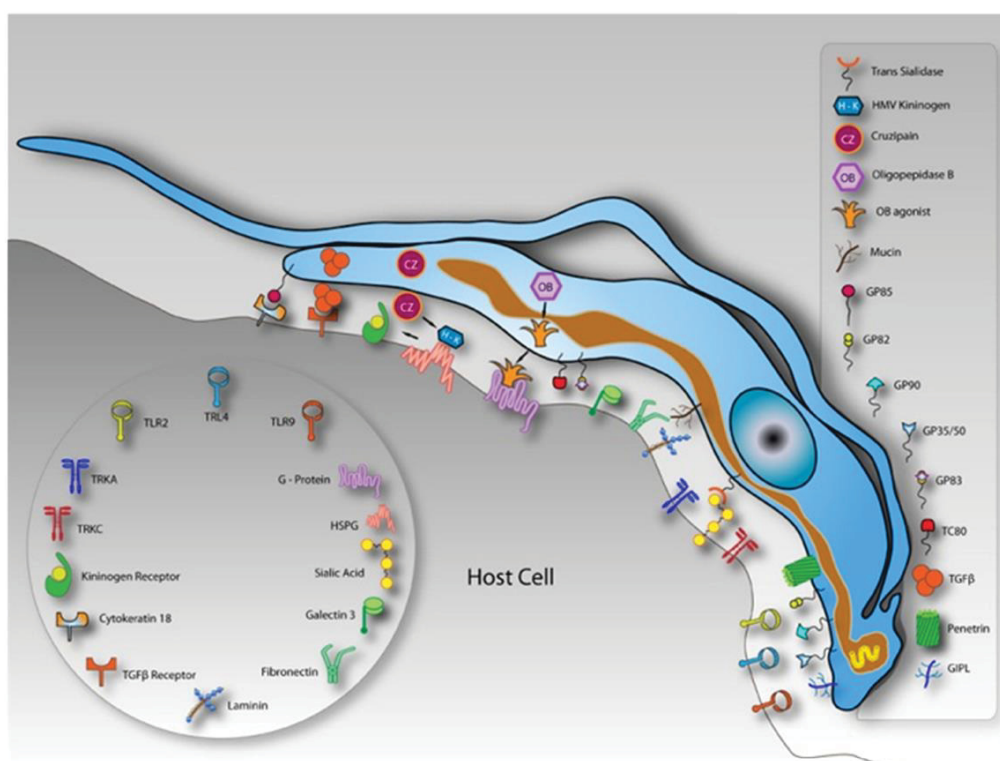
Relatada exclusivamente para formas tripomastigotas metacíclicas, a proteína gp82 é pertencente ao grupo II das transialidases e está envolvida no processo de internalização do parasito em células hospedeiras ao ativar uma via de sinalização de  $Ca^{2+}$ . Tal sinalização desencadeia a exocitose de lisossomos das células para a membrana plasmática, favorecendo a entrada do parasito por uma das vias de internalização conhecidas do protozoário, que é lisossomo dependente. Assim como gp82, as glicoproteínas gp35/50 também auxiliam no processo de invasão do parasito (CLEMENTE et al., 2016; DORTA et al., 1995; YOSHIDA, 2009).

Para ultrapassarem os componentes da matriz extracelular da célula hospedeira, os parasitos podem se ligar a fibronectina e laminina através de glicoproteínas da família gp85, e são capazes de hidrolisar colágeno e fibronectina por meio da atividade de POP gp80. Também já foi relatado que penetrina é capaz de

interagir com componentes da matriz extracelular, contribuindo para processos de adesão e invasão do *T. cruzi* (GIORDANO et al., 1999; OUAISSI et al., 1986).

As amastinas e as proteínas de superfície associadas às mucinas (MASP) constituem outros exemplos de proteínas de superfície envolvidas nos processos de adaptação do parasito aos hospedeiros (BAYER-SANTOS et al., 2013; KURUP e TARLETON, 2014).

De maneira geral, o parasito apresenta diversas moléculas de superfície que podem interagir com uma infinidade de moléculas da célula hospedeira (Figura 2).



**Figura 2:** *T. cruzi* apresenta diversas proteínas de superfície que interagem com o respectivo hospedeiro.

**Fonte:** Barrias, DeCarvalho e DeSouza (2013).

### 2.1.5. O ciclo de vida do *T. cruzi*

*T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo que alterna entre hospedeiros vertebrados, que inclui uma grande variedade de espécies de mamíferos; e hospedeiros invertebrados, que correspondem a insetos triatomíneos hematófagos (Hemíptera, Reduviidae) (BERMUDEZ et al., 2016; FAVILA-RUIZ et al., 2018). O parasito também alterna entre fases replicativas e não replicativas, sendo que nos hospedeiros mamíferos são encontradas duas formas evolutivas principais: amastigotas, que correspondem às formas replicativas detectadas no citoplasma da

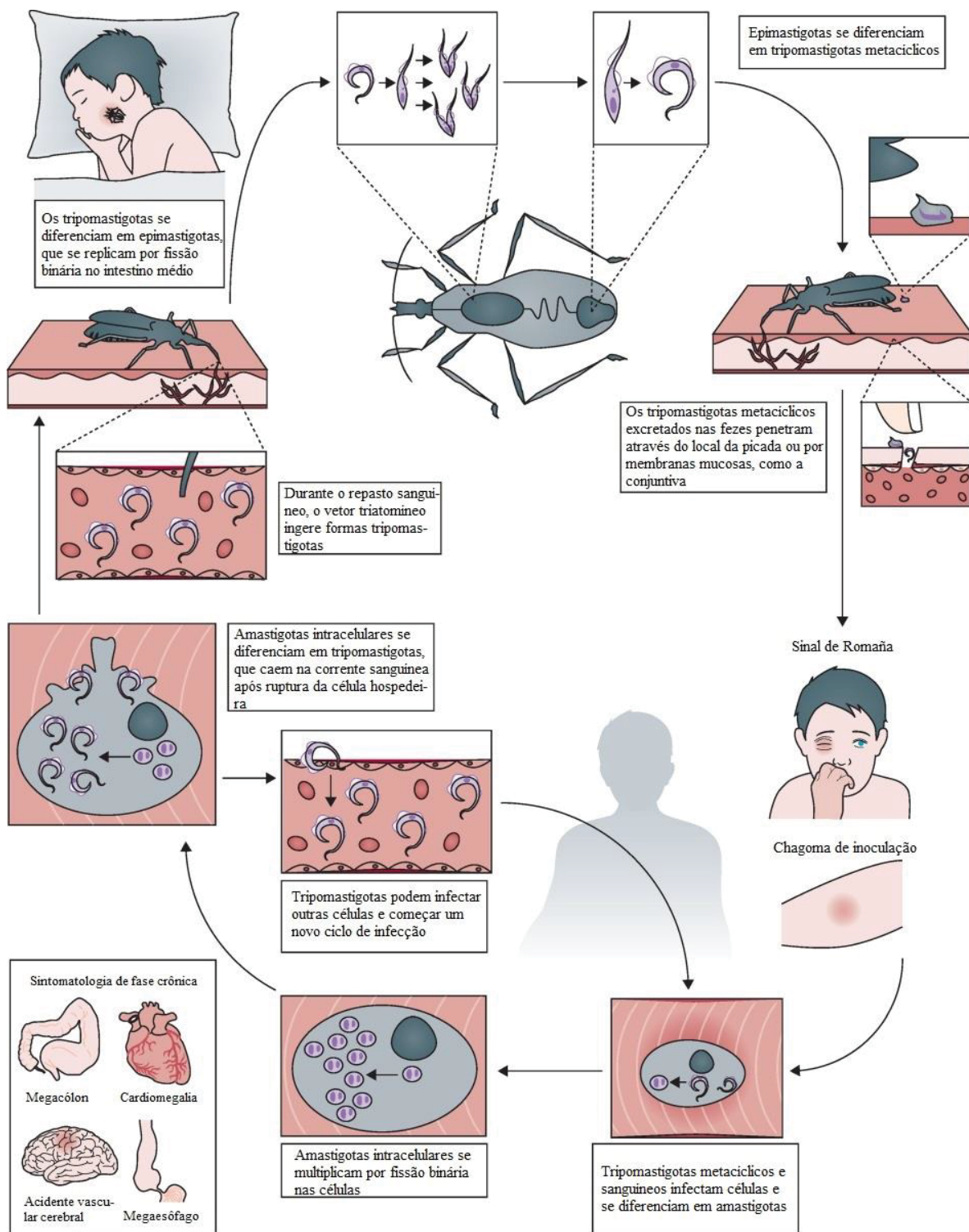
célula infectada, e formas não replicativas tripomastigotas, fase extracelular infecciosa originada de amastigotas ao final do ciclo intracelular e que pode ser encontrada na corrente sanguínea do hospedeiro. Por outro lado, no caso dos insetos vetores, encontram-se as formas replicativas epimastigotas e as formas não replicativas infecciosas tripomastigotas metacíclicas, localizadas no intestino médio e posterior do inseto, respectivamente (CALDERANO et al., 2014; DAMASCENO et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2018).

O inseto vetor se contamina ao ingerir formas tripomastigotas presentes na circulação sanguínea de um hospedeiro mamífero infectado. No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que por sua vez se dividem por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior do hospedeiro invertebrado. Tais formas são liberadas nas fezes e urina do triatomíneo e infectam o hospedeiro vertebrado através da porta de entrada gerada pela picada do vetor durante o repasto sanguíneo, por alguma solução de continuidade da pele ou mucosa (FUENTES-VICENTE et al., 2019; RAMÍREZ-GONZALEZ et al., 2019).

Uma vez no hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos possuem a capacidade de invadir uma ampla gama de células nucleadas fagocíticas e não fagocíticas, se diferenciam e se multiplicam como amastigotas. Por sua vez, as formas amastigotas replicativas se diferenciam em tripomastigotas no citoplasma da célula infectada. Em seguida, as células são lisadas, os tripomastigotas são liberados, caem na corrente sanguínea e infectam novas células, perpetuando os ciclos de multiplicação intracelular (BARRIAS et al., 2019; HERREROS-CABELLO et al., 2019).

Então, quando as formas tripomastigotas circulantes são captadas novamente pelos triatomíneos, a sequência de eventos descritos acima se repete (CARREA e DIAMBRA, 2016; CERETTI-JUNIOR et al., 2018; VANRELL et al., 2017).

O ciclo do parasito pode ser ilustrado como mostrado na Figura 3, abaixo.



**Figura 3:** Representação do ciclo de vida do *T. cruzi*.  
 Fonte: Imagem adaptada de Pérez-Molina e Molina (2018).

### 2.1.6. Mecanismos de evasão do sistema imune e de sobrevivência do *T. cruzi*

Como mencionado anteriormente, o *T. cruzi* possui a capacidade de infectar uma ampla variedade de células dos hospedeiros vertebrados. Mas para que o parasito possa estabelecer uma infecção a longo prazo, é necessária a evasão do sistema imunológico do hospedeiro infectado, assim como o parasito também precisa resistir a ambientes altamente oxidativos intrínsecos às células fagocíticas profissionais (ALVAREZ et al., 2011; NAGAJYOTHI et al., 2012; PIACENZA et al., 2009).

As formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguíneas são internalizadas por intermédio da formação de uma vesícula denominada de vacúolo parasitóforo, que posteriormente se funde ao lisossomo para formar os fagolisossomos (DeSOUZA, DeCARVALHO e BARRIAS, 2010). A partir desse momento, a sobrevivência do *T. cruzi* é dependente da produção de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e peroxidases, que permitem que o parasito resista a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas pelas células fagocíticas profissionais que podem eliminá-lo. Além disso, a acidificação do fagolisossomo estimula vias de sinalização do parasito, que o permite sair desse compartimento e contribui para a diferenciação do protozoário e multiplicação como amastigotas no citoplasma da célula infectada (CARDOSO, CUNHA e BARTHOLOMEU, 2016; GOES et al., 2016; NARDY, FREIRE-DE-LIMA e MORROT, 2015).

O processo de evasão do parasito dos fagolisossomos está associado a um processo de desialização de proteínas desse compartimento. As transialidases encontradas na superfície do parasito transferem o ácido siálico presente em proteínas na superfície interna do fagolisossomo (conhecidas como proteínas de membrana 1 e 2 associadas ao lisossomo (LAMP-1 e LAMP-2)) para as mucinas de superfície do protozoário, facilitando o rompimento do fagolisossomo por enzimas (Tc-Tox) produzidas e secretadas pelo *T. cruzi*, e que são formadoras de poros transmembrânicos (ALBERTTI et al., 2010; CARDOSO et al., 2015; RUBIN-DE-CELIS et al., 2006).

O parasito apresenta diversas moléculas, como as mucinas e glicoinositolfosfolipídeos, que podem ativar os receptores toll-like presentes em abundância em células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e células

dendríticas. A ativação dos receptores toll-like provoca a ativação de vias de sinalização que culminam na formação de uma resposta pró-inflamatória, necessária inicialmente para o controle da infecção. Apesar da taxa de infecção poder ser controlada e o controle da parasitemia parecer prejudicial ao parasito, tais mecanismos não são suficientes para eliminar a infecção, contribuindo tanto para que o hospedeiro não vá a óbito pela presença do parasito, assim como para a perpetuação do parasitismo (DOSREIS, 2011; PELLEGRINI et al., 2011; RODRIGUES, OLIVEIRA e BELLIO, 2012).

Outra barreira a ser evadida é o sistema complemento do hospedeiro. É relatado que proteínas de superfície do parasito, como calreticulina, GP160, CRIT, T-DAF e gp58/68 são importantes para bloquear diversas etapas das diferentes vias do complemento. O bloqueio impede a cascata de sinalização necessária para a formação do complexo de ataque à membrana que promove a lise do parasito (LIDANI et al., 2017; RAMÍREZ et al., 2011; SOSONIUK et al., 2014).

O protozoário também apresenta mecanismos de evasão de anticorpos produzidos pelo hospedeiro vertebrado, contudo, tal mecanismo será visto posteriormente.

### **2.1.7. Tratamento**

Introduzidos na década de 1970, os nitroderivados heterocíclicos Benznidazol (BZ) e Nifurtimox são as únicas drogas disponíveis até o momento para o tratamento da doença de Chagas, sendo que o Benznidazol é a primeira escolha para o tratamento da doença. No Brasil, o BZ é o único que tem a comercialização autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) devido à alta toxicidade do Nifurtimox. Tais fármacos agem através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos que provocam a morte do parasito por estresse oxidativo. Um problema enfrentado é que as drogas possuem maior eficácia na fase aguda da doença e não existe um tratamento eficaz quando a fase crônica, que é a forma clínica predominante, é estabelecida (CAMPO et al., 2018; MACLEAN et al., 2018; VALLE-REYES et al., 2017).

Mesmo nas doses terapêuticas, os medicamentos também afetam os tecidos saudáveis dos pacientes, provocando diversos efeitos colaterais como anorexia, insônia, náusea, cefaleia, tontura, astenia, dermatite esfoliativa, trombocitopenia, nervosismo, alucinações e convulsões. Tais efeitos, associados ao fato de o acesso

a medicação ainda ser limitado em muitos países endêmicos, e juntamente com o longo período de tratamento, acabam afetando negativamente a adesão dos pacientes aos tratamentos (DANTAS et al., 2017; FORSYTH, 2016; MORENO, et al., 2018; TARLETON, 2016).

Apesar dos esforços que vêm sendo realizados, não existe vacina para a doença de Chagas ou novas opções terapêuticas, de forma que a busca por compostos antichagásicos mais baratos, mais eficazes e melhor tolerados pelos pacientes é extremamente necessária.

## **2.2. A BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS ALTERNATIVAS**

Mesmo que a descoberta de fármacos mais eficazes e menos tóxicos seja necessária para o tratamento da Doença de Chagas, poucos ensaios clínicos foram realizados nos últimos tempos (JUNIOR et al., 2017).

Dentre os ensaios feitos, encontra-se o Posaconazol como uma possibilidade de quimioterápico. O fármaco atua como um inibidor seletivo da síntese de ergosterol necessário para o crescimento e sobrevivência do parasito em todos os estágios do ciclo de vida, e se mostrou eficiente contra o *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, mas falhou na fase II dos ensaios clínicos. Outro problema é que o alto custo associado ao Posaconazol inviabiliza sua utilização em países em desenvolvimento (LEAVER, 2018; LINARES, 2018; MOLINA et al., 2014).

O Ravuconazol também foi testado na fase II de ensaios clínicos e, ainda que promissor, apresentou desvantagens em relação a utilização do Benznidazol (DNDi, 2013; TORRICO et al., 2018).

Também há estudos que visam a melhoria das condições de saúde da população infectada com o *T. cruzi*, como é o caso da iniciativa da Fundação Oswaldo Cruz e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. A Fundação está realizando ensaios clínicos de fase III (ClinicalTrials.gov, identificador: NCT00875173) para avaliar se a suplementação oral com selênio é capaz de reduzir a progressão de disfunções cardíacas em pacientes chagásicos, com previsão de finalização dos estudos em 2020.

Outras pesquisas apostam na busca de moléculas com atividade tripanocida a partir de compostos naturais (IZUMI et al., 2011), como aqueles provenientes de algas marinhas vermelhas (*Plocamium brasiliense*), hidroides (*Macrorhynchia philippina*),

óleos essenciais de *Lippia alba* e *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb, e que foram descritos em trabalhos por Teixeira et al. (2019), Lima et al. (2019), Moreno et al. (2018) e Gutiérrez et al. (2019), respectivamente.

Contudo, mesmo que os produtos naturais sejam uma fonte para a busca de novos compostos terapêuticos, as empresas farmacêuticas são hesitantes em investir nessa área, e passam a explorar bibliotecas disponíveis de compostos químicos para o encontro de novas medicações (PATRA et al., 2018). A busca de novas abordagens terapêuticas voltadas para melhorar a aplicabilidade de medicamentos já existentes também vem sendo exploradas, como aquelas associadas a área da nanotecnologia (SHI et al., 2010).

Na medicina, a nanotecnologia pode ser investigada para diversas aplicações, como compondo sistemas de entregas de drogas, que podem contribuir para direcionar medicações de forma localizada, reduzindo doses e efeitos colaterais associados aos medicamentos (ASHFAQ et al., 2017; PATRA et al., 2018). No diagnóstico *in vitro*, os nanosensores podem ser aplicados para detectar biomarcadores de doenças e, para imageamento *in vivo*, as nanossondas se mostram uma maneira mais rápida e menos invasiva para diagnosticar enfermidades (BAETKE, LAMMERS e KIESSLING, 2015; DU et al., 2019; SHI et al., 2010; WOLFRAM et al., 2016).

As nanopartículas também podem ser aplicadas em novas técnicas terapêuticas, como no caso de nanopartículas metálicas e semicondutoras, em que o elemento químico associado, como o ouro, é capaz de converter luz absorvida em calor localizado, podendo ser exploradas para a terapia fotoelétrica (Prashant et al., 2007).

Em tripanossomatídeos, Momeni et al. (2013) encapsularam Miltefosina em lipossomos (nanopartículas de composição lipídica) para o tratamento de camundongos infectados com *Leishmania major*. A formulação foi capaz de reduzir o número de amastigotas intracelulares e o tamanho da lesão cutânea. Asthana et al. (2015) relataram que Anfotericina B encapsulada em nanopartículas de quitosana com manose podem constituir uma alternativa mais seletiva para o tratamento de leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum*, assim como Morilla, Prieto e Romero (2005) também demonstraram a possibilidade de melhorar o tratamento da Doença de Chagas ao encapsularem o Benznidazol em lipossomos.

### 2.2.1. Estratégias alternativas para alvejar patógenos: scFv e nanobodies

Com a limitação de opções terapêuticas para diversas doenças, novas abordagens estão sendo desenvolvidas para estudos que contribuem para a elaboração de novos tratamentos, técnicas de controle e diagnóstico de infecções. Além do que foi descrito anteriormente, muitas abordagens tentam contornar as limitações apresentadas para a utilização de anticorpos, como a dificuldade e os altos custos para serem produzidos devido à necessidade de imunização animal. Outro obstáculo é que o tamanho da molécula dificulta a penetração tecidual e, conseqüentemente, sua biodistribuição (STEELAND, VANDENBROUCKE e LIBERT, 2016).

Nesse sentido, há um aumento em estudos que utilizam Single-chain variable fragment (scFv), que são anticorpos engenheirados para possuírem apenas os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas, conectados por um peptídeo curto. Essa estrutura permite que a molécula mantenha a capacidade de reconhecimento ao antígeno e, em virtude do tamanho reduzido, há maior difusão tecidual da molécula e menor tempo de retenção em tecidos não alvo (FERCHER et al., 2017, XU et al., 2017).

Ainda que inicialmente produzidos a partir de hibridomas, células esplênicas de camundongos imunizados e linfócitos B (apesar de o *design* dos scFvs também poder ser feito *in silico*), os scFvs, uma vez clonados, podem ser produzidos mais facilmente, por exemplo, em sistemas procarióticos, permitindo a expressão de uma quantidade muito maior da molécula em comparação com os rendimentos obtidos para a produção de anticorpos convencionais. Também, quando consideramos a busca por moléculas ligantes a determinados alvos, a geração de bibliotecas de scFvs permite a substituição de processos de imunização animal e geração de hibridomas. A busca por ligantes pode ser ainda mais facilitada quando bibliotecas de scFvs são criadas a partir da expressão das moléculas na superfície de bacteriófagos filamentosos, em uma técnica conhecida como *Phage display* (ver a seguir) (AHMAD et al., 2012; MALA et al., 2017; NELSON, 2010).

A utilização de scFvs é muito relatada em estudos de diversos tipos de câncer (SOKOLOWSKA-WEDZINA et al., 2017; DURANTI et al., 2018; KELLY et al., 2008; LU et al., 2019), mas as moléculas também podem contribuir no estudo de inúmeras outras áreas. No caso de parasitoses, a utilização de anticorpos recombinantes na

forma de scFv já foi relatada para desenvolver uma estratégia de vacinação para melhorar a proteção contra a infecção crônica por *T. gondii* (LAKHRIF et al., 2018), assim como foi elaborado um scFv por Ayub et al (2012) que reconhece a porção C-terminal da proteína P2 $\beta$  ribossomal de *T. cruzi*, demonstrando que a proteína pode constituir um alvo para agentes terapêuticos.

É notável que os scFvs são moléculas promissoras, mas a sua produção inicial pode ser laboriosa e dispendiosa e, apesar de os níveis de produção serem maiores em comparação com a produção de anticorpos convencionais, os rendimentos podem variar muito de acordo com o sistema de expressão (CRIVIANU-GAITA e THOMPSON, 2016).

Há também um aumento no emprego de nanobodies, que são anticorpos de domínio único derivados de anticorpos de cadeia pesada encontrados em camelídeos, apresentam um tamanho ainda mais reduzido em comparação com os scFvs, o que favorece a sua aplicação para o reconhecimento de alvos de difícil acesso, além de possuírem alta solubilidade e estabilidade (INGRAM, SCHIMIDT e PLOEGH, 2018; SHATALOVA et al., 2019).

A metodologia já foi realizada por Obishakin et al (2014), que identificaram um nanobody que alvejava uma proteína paraflagelar de diversas espécies de *Trypanosoma*, apresentando potencial para o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos. A estratégia também foi utilizada por Seow et al (2017) para estudos que contribuem com o desenvolvimento de vacinas contra *Plasmodium falciparum*.

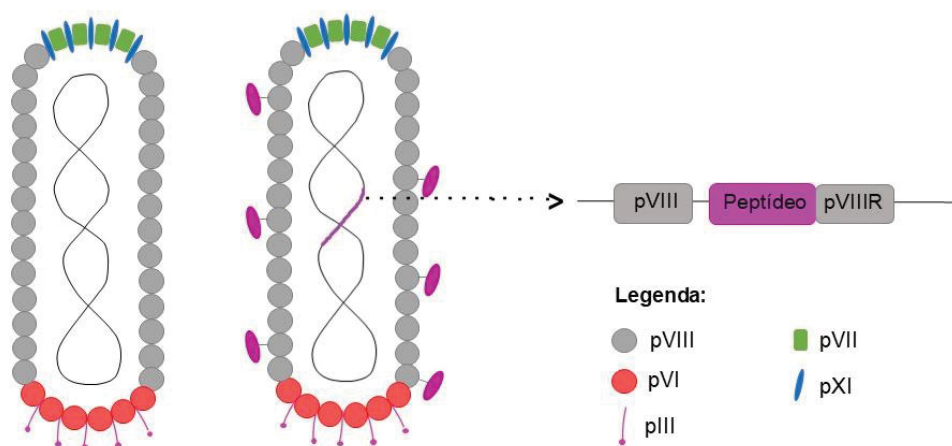
Os nanobodies são considerados de baixa imunogenicidade por possuírem sequências semelhantes a domínios variáveis de cadeias pesadas de anticorpos humanos, mas já foi relatado que as moléculas apresentam meia-vida curta em experimentos *in vivo*. Um outro problema enfrentado que dificulta a realização da abordagem é a necessidade de expor os camelídeos ao antígeno de interesse (AUDENHOVE e GETTEMANS, 2016; LIU et al., 2018).

Por outro lado, uma metodologia baseada na busca por peptídeos, a partir de bibliotecas, que se liguem a determinados antígenos com alta afinidade tem um enorme potencial para a elaboração de novas metodologias de tratamento e para prevenção de infecções. A vantagem é que essa abordagem pode se mostrar mais barata, rápida, fácil e os peptídeos selecionados podem mimetizar proteínas do hospedeiro, reduzindo sua imunogenicidade e favorecendo sua utilização em hospedeiros infectados.

## 2.2.2. Utilização da técnica de *Phage display* para identificação de ligantes

A técnica de *Phage display* foi inicialmente desenvolvida por Smith (1985) e se baseia na apresentação de peptídeos/proteínas na superfície de bacteriófagos filamentosos (M13, fd, f1) a partir da manipulação de genes que codificam proteínas de revestimento viral (RAMI et al., 2017).

Tais fagos possuem um ciclo de vida não lítico, liberando continuamente novas partículas virais a partir da infecção de estirpes de *E. coli* que expressam o pilus sexual (F+), necessário para a ancoragem e infecção do vírus. Nessa técnica, os materiais genéticos que codificam os peptídeos de interesse são inseridos no genoma viral em uma região que codifica proteínas de revestimento do fago, levando à expressão de peptídeos recombinantes fusionados na região N-terminal de proteínas do capsídeo (figura 4) (LOPES et al., 2018; LOSET e SANDLIE, 2012).



**Figura 4:** Bacteriófagos filamentosos são modificados geneticamente para expressar peptídeos fusionados a proteínas do capsídeo viral.

À esquerda, representação de um bacteriófago selvagem (WT), que corresponde ao fago não modificado, enquanto que à direita, um bacteriófago modificado para expressar peptídeos fusionados na porção N-terminal da proteína pVIII pode ser observado.

**Fonte:** A autora.

Todas as proteínas de superfície viral podem ser empregadas para a realização da técnica, mas as principais utilizadas nesse sistema são as pVIII, que constituem as principais proteínas de capsídeo viral, estão presentes aproximadamente em 2.700 cópias no fago e são utilizadas geralmente para a apresentação de pequenos peptídeos; e pIII, muito utilizadas para a apresentação de peptídeos maiores, domínios proteicos ou até mesmo proteínas inteiras. A técnica, de baixo custo e fácil realização, permite a identificação de ligantes para diversos alvos, como proteínas,

células, carboidratos e até mesmo organismos inteiros a partir de vários ciclos de seleção, denominados de *biopanning*, e amplificação viral. Assim, o isolamento de ligantes de alta afinidade é feito à medida que ocorre o enriquecimento progressivo dos fagos após cada ciclo de seleção (LAUSTSEN et al., 2017; LU et al., 2018; MARVIN, SYMMONS e STRAUS, 2014).

Através da técnica de *Phage display*, Gan et al. (2018) encontraram um peptídeo de penetração celular (CPP) que foi internalizado em células A341 (células epiteliais de carcinoma epidermóide de pele humana) via receptor do fator de crescimento epidermal (EGFr), mas não em células normais NHDF (Fibroblastos dérmicos humanos normais). Estes resultados demonstraram que esse peptídeo pode servir como um ligante para direcionar e entregar nanopartículas conjugadas contendo fármacos, aumentando a eficácia das drogas ao mesmo tempo que reduziria a toxicidade medicamentosa.

A técnica tem aplicações diversas e já foi utilizada em estudos que contribuem para o desenvolvimento de vacinas contra a raiva (YANG et al., 2013), candidíase sistêmica (SHI et al., 2018) e contra o vírus influenza (HIRANO et al., 2018). A mesma estratégia também foi abordada nos trabalhos de Oliveira et al (2016), Peng et al (2018), Kumar et al., (2017), Wang et al., (2016), Wang et al (2014), que relataram a descoberta de peptídeos que podem ser utilizados como ferramentas para diagnósticos ou para novas terapias relacionadas com infecção contra *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, câncer de bexiga, HIV-1, câncer de ovário e glioblastoma, respectivamente.

Com relação aos tripanossomatídeos, a técnica de *Phage display* foi utilizada por Costa et al (2017), Machado et al (2015a, 2015b) e por Ramos et al (2016) em um estudo para identificação de peptídeos que podem ser utilizados no diagnóstico e para o desenvolvimento de vacina contra leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum*, assim como para melhorar o diagnóstico de leishmaniose tegumentar (COSTA et al., 2016). Em *T. cruzi*, Teixeira et al (2015) encontraram um peptídeo que inibiu a invasão dos parasitos em células LLC-MK2, possivelmente em virtude da impossibilidade de o protozoário interagir com citoqueratinas, proteínas do filamento intermediário, via gp85. Além disso, também já foi relatado que o receptor de proquinecitina está envolvido no processo de invasão do parasito via interação com Tc85, que são glicoproteínas pertencentes às transialidasas (KHUSAL et al., 2015).

Tais estudos auxiliam na descoberta dos detalhes moleculares pelos quais o parasito é capaz de infectar as células.

De maneira geral, a técnica de *Phage display* se mostra promissora no estudo de ligantes que podem ser utilizados para diversas finalidades, como o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas, vacinas e diagnósticos, como relatado anteriormente.

### 3. JUSTIFICATIVA

Anteriormente restrita às Américas, a doença de Chagas agora está também presente na Europa, Ásia e Oceania, e causa sérios prejuízos para a economia dos países afetados. As únicas duas medicações existentes possuem eficácia variável e provocam diversos efeitos colaterais aos pacientes, sendo necessário que novas terapias sejam desenvolvidas, assim como melhorias nas medicações em uso precisam ser realizadas (JUNIOR et al., 2017; MONCAYO e SILVEIRA, 2009; THE LANCET, 2019).

As interações que os patógenos realizam com os hospedeiros são essenciais para a perpetuação da infecção e sua sobrevivência. Apesar de muitos estudos serem realizados para a descoberta de moléculas essenciais para a interação patógeno-hospedeiro, as técnicas bioquímicas convencionais utilizadas são limitadas para a avaliação de um número elevado de moléculas de superfície. Nesse cenário, a técnica de *Phage display* constitui uma abordagem fácil e de rápida realização para se fazer a seleção de moléculas ligantes em bibliotecas de fagos expressando peptídeos/anticorpos para se encontrar alvos potencialmente importantes dos patógenos (COELHO et al., 2015; FERMIN, RAMPERSAD e TENNANT, 2018; FREI e LAI, 2016).

Recentemente, MacGregor et al. (2019) utilizaram a técnica de *Phage display* e encontraram um anticorpo ligante a superfície de *Trypanosoma brucei*. Tal anticorpo, fusionado a uma toxina (PBD), foi capaz de alvejar especificamente o protozoário e de eliminar totalmente o parasito 2 dias pós-tratamento em camundongos infectados. Tais resultados demonstram a grande capacidade da técnica de *Phage display* para encontrar moléculas ligantes com potencial para serem utilizadas no tratamento de doenças que precisam de novas terapias.

Como mencionado em tópicos prévios, o *T. cruzi* apresenta uma grande diversidade de proteínas de superfície que constituem importantes alvos de moléculas que podem interferir na viabilidade do parasito, seja no hospedeiro vertebrado ou invertebrado. Assim, a utilização da técnica de *Phage display* para selecionar moléculas que alvejam formas tripomastigotas derivadas de cultura de células do parasito poderá contribuir no desenvolvimento de terapias antichagásicas.

As pesquisas envolvendo a descoberta de moléculas ligantes podem permitir avanços nos sistemas de entrega de drogas por proporcionar interação de forma mais específica com o parasito e, conseqüentemente, aumentam a eficiência do tratamento com drogas já liberadas, reduzindo possíveis efeitos adversos aos pacientes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a capacidade de interação de peptídeos à superfície de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizando a tecnologia de *Phage display*.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Identificar, a partir de uma biblioteca denominada X15<sup>1</sup>, clones de bacteriófagos que expressam peptídeos ligantes a superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por meio da técnica de *Phage display*;

Metas:

- Realizar *biopannings* para identificação de clones ligantes de superfície de formas tripomastigotas;
- Sequenciar e analisar *in silico* as sequências de DNA que codificam os peptídeos expressos pelos clones de fagos ligantes selecionados.

4.2.2. Identificar provável interação parasito::hospedeiro por análises *in silico*;

---

<sup>1</sup> A biblioteca X15 foi construída por Bonnycastle et al (1996) através de clonagem de códons aleatórios e é composta por bacteriófagos que expressam em sua superfície peptídeos contendo 15 aminoácidos randômicos e fusionados na proteína VIII dos fagos f88.4.

4.2.3. Validar a capacidade de ligação dos clones de bacteriófagos que interagem com as formas tripomastigotas por meio de Cell-ELISA;

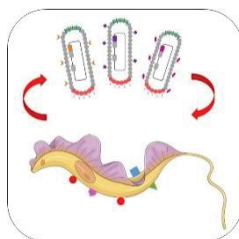
4.2.4. Avaliar a capacidade dos peptídeos (bacteriófagos, ou peptídeo sintético) em interferir com a infectividade dos parasitos em monocamadas celulares.

4.2.5. Avaliar se peptídeo sintético selecionado é capaz de alterar a viabilidade dos parasitos e das células hospedeiras.

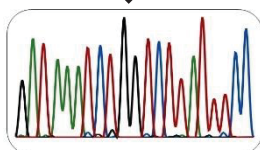
## **5. METODOLOGIA**

Nossos ensaios realizados podem ser resumidos conforme demonstrado no fluxo de trabalho abaixo.

## Fluxo de trabalho



*Biopannings*



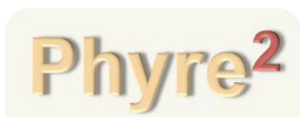
Sequenciamento dos clones de fagos selecionados



Análises de bioinformática



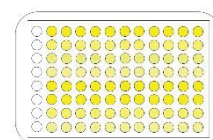
1. Busca de proteínas miméticas do hospedeiro vertebrado



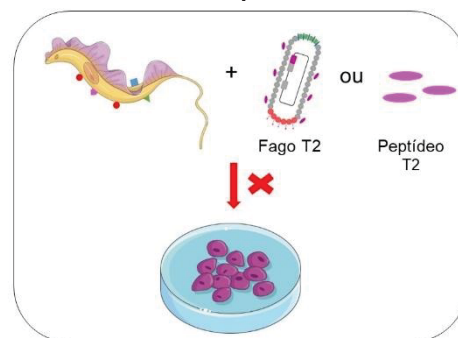
2. Predição 3D das proteínas fornecidas pelo BLAST



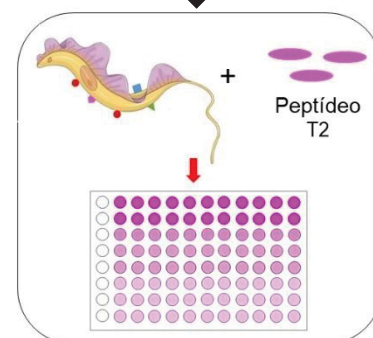
3. Busca de domínios conservados entre os peptídeos



1. Comprovação da capacidade de ligação dos clones selecionados por Cell-ELISA



2. Ensaio de bloqueio de infecção



3. Ensaio de viabilidade

## 5.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS

Células da linhagem LLC-MK2 (célula epitelial de rim de macaco Rhesus) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB). O cultivo celular foi realizado em frascos de cultura, em incubadora à temperatura de 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade relativa (MARCHIORI et al., 2017; WANG et al., 2018).

Quando em semi confluência, as culturas celulares foram tripsinizadas e mantidas nas mesmas condições acima descritas. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido e monitoradas quanto ao aspecto morfológico, crescimento celular e presença de contaminantes. Além disso, alíquotas de células foram congeladas e descongeladas de acordo com a necessidade dos experimentos.

## 5.2. OBTENÇÃO DOS PARASITOS

### 5.2.1. Manutenção dos parasitos e condições de cultivo

Formas epimastigotas da cepa DM28c de *T. cruzi* foram cultivadas e mantidas a 28 °C e em meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (PASCUALE et al., 2017) e 1 % de antibióticos (10.000 UI penicilina e 10.000 mg estreptomicina).

### 5.2.2. Metaciclogênese

A obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas pode ser realizada *in vitro* sob condições quimicamente definidas, como reportado por Contreras et al. (1985). Neste processo, formas epimastigotas são submetidas a um estresse nutricional ao serem incubadas em um meio artificial, denominado TAU (Triatomine Artificial Urine), que possui composição e pH semelhantes à urina do inseto vetor, seguido de incubação em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com glicose e aminoácidos) (GONÇALVES et al., 2018). Para a diferenciação *in vitro*, uma concentração de  $5 \times 10^7$  parasitos/mL de formas epimastigotas ao final da fase exponencial foram recuperadas por centrifugação a 3000 x g, 10 minutos e a 10 °C, e incubadas em meio TAU por 2 h a 28 °C, com posterior diluição dos parasitos em meio TAU3AAG para uma concentração final de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL (AMORIM et al., 2017).

Após um período de aproximadamente 5 dias, as formas tripomastigotas metacíclicas foram purificadas utilizando DEAE-celulose (SOUSA, 1983) empacotada em coluna pequena (seringa de 10 mL) e previamente equilibrada com três volumes de coluna de PBS 1 x contendo 2 % de glicose.

O processo de purificação foi acompanhado através da observação em microscópio, com o auxílio da câmara de Neubauer, de 10 µL de alíquotas de 1 mL recolhidas a partir do momento da inserção da amostra na coluna.

A quantidade de parasitos/mL foi determinada pela contagem na câmara de Neubauer e utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Parasitos/mL} = \text{N}^\circ \text{ de parasitos contados nos 5 quadrantes} \times 5 \times 10.000$$

### **5.2.3. Obtenção das formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular (TCT)**

Para a obtenção dos TCTs, monocamadas de células LLC-MK2 foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas (item 5.2.2) na proporção 10:1 parasitos/célula por 24 h a 37 °C (LEITE et al., 2018; VALENZUELA et al., 2018). Então, as culturas foram lavadas com RPMI sem soro para remover os parasitos não internalizados e tratadas com meio RPMI suplementado com 10 % de soro de cavalo para remover as formas epimastigotas sensíveis a lise por fatores do sistema complemento (RAMÍREZ-TOLOZA e FERREIRA, 2017). Posteriormente, as culturas infectadas foram mantidas em meio RPMI suplementado com 5% de SFB, sendo o meio de cultivo trocado diariamente até a liberação dos TCTs.

Os TCTs obtidos foram congelados ( $1 \times 10^7$  parasitos/mL) em solução contendo 90 % de SFB e 10 % de DMSO para serem utilizados na manutenção da infecção em novas monocamadas celulares para produção de TCTs necessários em ensaios posteriores. Nesse caso, a manutenção das culturas infectadas foi realizada como descrito no parágrafo acima.

## **5.3. SELEÇÃO *IN VITRO* DOS PEPTÍDEOS LIGANTES**

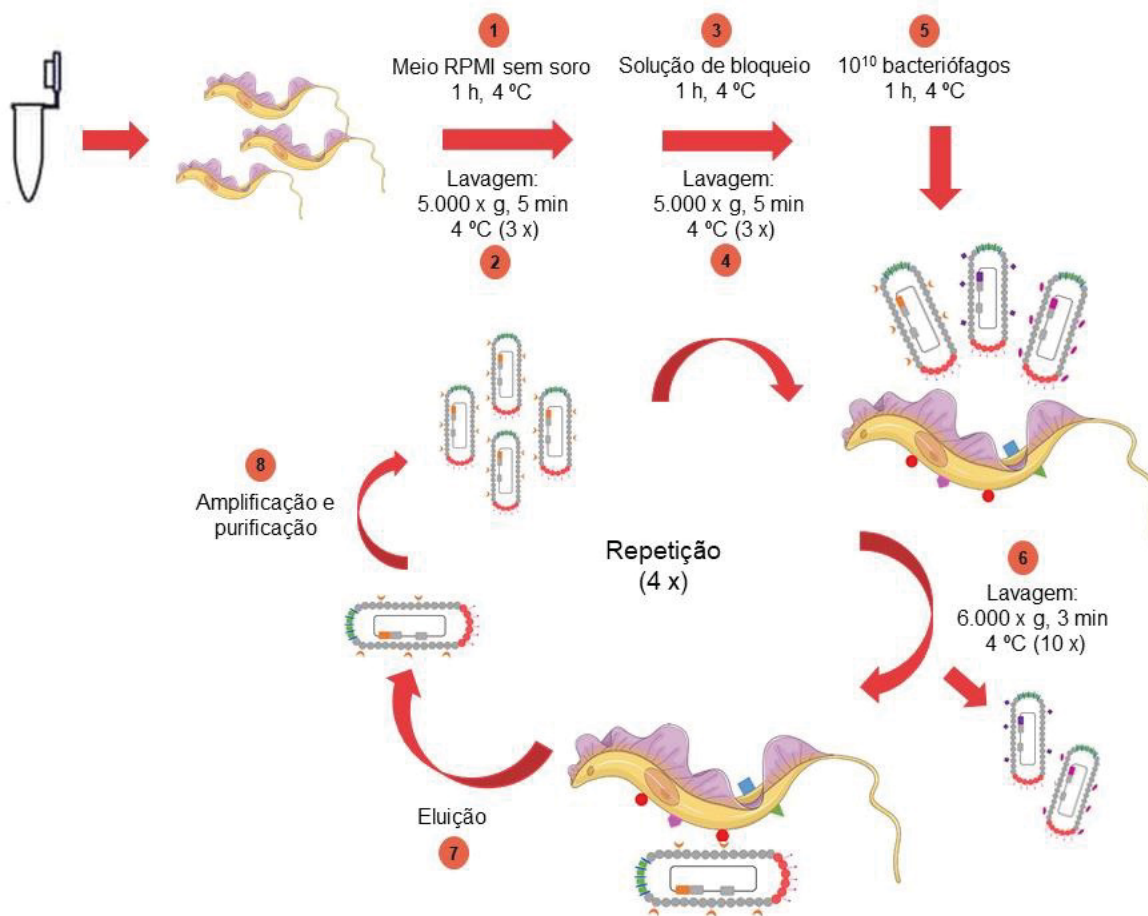
### **5.3.1. *Biopanning***

A seleção *in vitro* (Figura 5), assim como a amplificação, purificação (item 5.3.2) e titulação dos bacteriófagos (item 5.3.3) foi feita de acordo com Saénz-Garcia (2020), com algumas modificações. No procedimento de seleção,  $1 \times 10^7$  tripomastigotas vivos foram recuperados de cultura por centrifugação a 5.000 x g, 4 °C durante 5 min,

e incubados em RPMI sem soro. Posteriormente, os parasitos foram mantidos em solução de bloqueio (TBS + BSA 5 mg/mL) e expostos a  $10^{10}$  TU de bacteriófagos da biblioteca X15 (construída por Bonnycastle et al. (1996) e fornecida gentilmente pela Dra Juliana Ferreira de Moura). Para retirar os fagos não ligantes, os parasitos foram lavados 10 vezes em solução de lavagem (TBS acrescido de 0,1 % de Tween 20) por 3 min, 6.000 x g a 4 °C. Para recuperar os fagos ligantes, adicionou-se 150 µl da solução de eluição (0,1 N HCl, glicina 0,1 M e BSA 1 mg/mL) por 10 min, RT e em baixa agitação, seguido da adição de 200 µl de solução de neutralização (Tris-HCl 0,1 M, pH 9,0).

Após os processos de incubação com RPMI sem soro e solução de bloqueio, os parasitos foram lavados com solução de lavagem por 5 min, 5.000 x g e 4 °C. Tais condições de centrifugação também foram utilizadas após a adição da solução de neutralização para recuperar os fagos ligantes (presentes no sobrenadante após a centrifugação) a serem utilizados para titulação (item 5.3.3) e amplificação (item 5.3.2) necessárias para a realização do *biopanning* seguinte.

Ao total, o procedimento foi feito 4 vezes para a seleção dos clones que interagem com maior afinidade com a superfície de *T. cruzi*, sendo que todos os *biopannings* foram realizados nas mesmas condições acima descritas.



**Figura 5:** Representação das etapas realizadas para cada ciclo do processo de *biopanning*.  $1 \times 10^7$  formas tripomastigotas foram incubadas com  $10^{10}$  TU de bacteriófagos da biblioteca X15 por 1 h. Posteriormente os fagos não ligantes foram lavados e os fagos selecionados foram recuperados, amplificados, titulados e utilizados para os demais ciclos de *biopanning*.

**Fonte:** A autora.

### 5.3.2. Amplificação e purificação dos bacteriófagos

Uma colônia isolada de *E. coli* K91 foi inoculada e cultivada em 5 mL de meio LB (Luria Bertani) por aproximadamente 16 h a 37 °C e 150 rpm. Posteriormente, 1 mL da cultura foi adicionada em 50 mL de meio LB a 250 rpm e 37 °C. Quando a densidade ótica ( $D.O_{550}$ ) atingiu 1,8, a rotação foi reduzida para 50 rpm durante 30 min para o crescimento do pilus sexual.

Em seguida, a cultura foi infectada com 20  $\mu$ L de fagos por 15 min, RT e leve agitação a cada 2 min. Então, 1 mL da cultura infectada foi diluída em 50 mL de meio LB contendo 4  $\mu$ g/mL de tetraciclina e incubada por 30 min, 250 rpm e 37 °C. Por fim, a concentração de tetraciclina foi ajustada para 20  $\mu$ g/mL e a cultura foi mantida em agitação *overnight* nas mesmas condições acima descritas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 3.000 x g, 4 °C por 20 min, o sobrenadante foi recuperado e adicionou-se 20 % (v/v) de PEG 8000. Os frascos foram invertidos 150 vezes e os fagos foram deixados em precipitação *overnight* a 4 °C. Então, a amostra foi centrifugada a 3.500 x g, 4 °C por 1 h 30 min, o sobrenadante foi eliminado e o pellet foi ressuscitado em 3 mL de TBS, com adição subsequente de 20% (v/v) de PEG 8000 por 4-5 h a 4 °C.

Para a recuperação dos fagos em precipitação, a solução foi centrifugada a 6.000 x g, 4 °C por 40 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de TBS, que novamente foi centrifugado a 6.000 x g, 4 °C por 10 min para retirar as bactérias residuais e, por fim, o sobrenadante foi recuperado e estocado a 4 °C.

### 5.3.3. Titulação dos bacteriófagos

A titulação dos bacteriófagos provenientes após o processo de *biopanning* (titulação parcial) e após amplificação (titulação final) (item 5.3.2) foi feita utilizando *E. coli* K91.

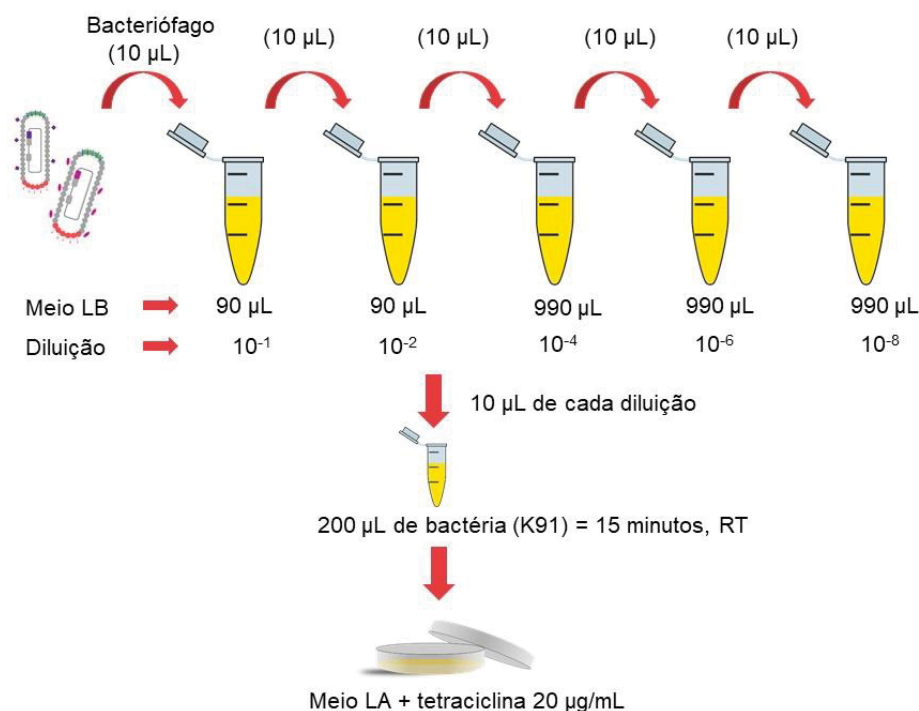
Inicialmente, as amostras contendo os bacteriófagos foram diluídas em meio LB nas concentrações de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-8</sup> (Figura 6) e aquecidas a 65 °C por 15 min para eliminar bactérias residuais.

Uma colônia isolada de *E. coli* K91 foi preparada conforme descrito no item 5.2.2. Após o crescimento do pilus sexual, 10 µL de cada diluição foram incubados com 200 µL de bactéria por 15 min, RT e então, as bactérias foram plaqueadas em placas de ágar contendo 20 µg/mL de tetraciclina. Subsequentemente, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 h e, em seguida, as colônias foram contadas. A quantidade de fagos, expressa em TU/mL, foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Quantidade de fagos (TU/mL)} = \text{N}^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{fator de diluição} \times 100$$

Observação 1: Após o aquecimento das diluições dos fagos, as amostras eram imediatamente incubadas em gelo para que os bacteriófagos não perdessem a viabilidade (e o tempo de incubação não deve exceder 15 min).

Observação 2: O tempo de infecção das bactérias não deve ultrapassar 15 min, para que o ciclo do bacteriófago não se complete e o fago passe a infectar novas bactérias (o resultado seria superestimado).



**Figura 6:** Esquematização do processo de titulação dos bacteriófagos.

As diluições de fagos foram incubadas com bactérias *E. coli* K91 por 15 min. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em placas de ágar contendo tetraciclina e, após aproximadamente 16 h, o número de colônias foi contado e a concentração de fagos é calculada.

**Fonte:** A autora.

#### 5.4. PCR E SEQUENCIAMENTO

Para identificar os peptídeos expressos pelos fagos ligantes, colônias de bactérias *E. coli* K91 infectadas com os fagos selecionados foram aleatoriamente escolhidas e a região PVIIIR (região que contém a sequência do peptídeo expresso pelo fago) do genoma do fago foi amplificada duas vezes por PCR (Polymerase Chain Reaction) para obter maior quantidade do produto da PCR (uma amplificação única se mostrou pouco eficiente). Finalmente, os produtos de amplificação foram sequenciados utilizando a tecnologia de Sanger (GOMES e KORF, 2018) pela empresa GoGenetic.

A PCR foi realizada por 35 ciclos em um termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. As condições e os iniciadores utilizados para a reação estão

resumidos na Tabela 1. Para o sequenciamento, o iniciador F88.4\_1\_Forward foi utilizado.

**Tabela 1:** Iniciadores e condições utilizadas para a realização da PCR

|                      |   |           |
|----------------------|---|-----------|
| Iniciador forward    | F88.4_1_Forward: 5'-CCTTTAATCGGCCTCCTGTT-3' |           |
| Iniciador reverse    | Claude-F.88.4_Rev: 5'-TCGGCAAGCTCTTTTAGG-3' |           |
| Desnaturação inicial | 95 °C - 5 minutos                           | 35 ciclos |
| Desnaturação         | 95 °C - 1 minuto                            |           |
| Anelamento           | 57 °C - 30 segundos                         |           |
| Extensão             | 72 °C - 45 segundos                         |           |
| Extensão final       | 72 °C - 5 minutos                           |           |
| Resfriamento         | 10 °C - ∞                                   |           |

**Fonte:** A autora (2019).

## 5.5. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As sequências obtidas com o sequenciamento foram traduzidas com o auxílio da ferramenta EMBOSS translation tools (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) e analisadas através da ferramenta de bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), baseando-se nos dados de proteínas humanas para encontrar proteínas do hospedeiro vertebrado mimetizadas pelos peptídeos selecionados.

A ferramenta online Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) foi utilizada para fazer as previsões das estruturas 3D das proteínas preditas pelo BLASTp, no intuito de visualizar a localização da sequência da proteína predita que foi coberta pelo alinhamento. As estruturas 3D foram visualizadas e modificadas com o auxílio do programa Swiss PDB Viewer (<https://spdbv.vital-it.ch/>)<sup>2</sup>.

Além disso, a ferramenta MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) foi utilizada para encontrar domínios conservados entre as sequências dos peptídeos selecionados.

<sup>2</sup> Necessário a realização do download do programa.

## 5.6. CONFIRMAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS

O ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) foi realizado para confirmar a capacidade de ligação dos clones isolados após a realização dos quatro ciclos de *biopannings* (NORBURY et al., 2019; SAW e SONG, 2019).

Para isso,  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas foram fixadas *overnight* em placa de 96 poços utilizando 2 % de paraformaldeído (GALETOVIC et al., 2011; TAYLOR et al., 2020). Então, os parasitos foram incubados com solução de bloqueio (PBS 1 x contendo 5 % de leite em pó desnatado) e, em seguida, com  $10^9$  TU de bacteriófagos. Para detectar os fagos ligantes, anticorpos anti-M13 (diluição 1:2.000 (MA et al., 2019)) conjugados com peroxidase foram adicionados aos poços da placa, com posterior incubação com solução de revelação (0,2 mg/mL de OPD em tampão citrato, pH 5,0, contendo 0,03 % de  $H_2O_2$ ) por 15 min. Por fim, a placa foi lida em leitor de placas a 495 nm.

Entre todos os passos realizados, os poços da placa foram lavados três vezes com solução de lavagem (PBS 1 x com 0,05 % de Tween e 150 mM de NaCl), com centrifugação a 3000 rpm, 4 °C e 2 min entre cada lavagem. As etapas de incubação com a solução de bloqueio, bacteriófagos e anticorpo anti-M13 foram feitas por 1 h e a 37 °C e as duas últimas etapas mencionadas foram feitas em tampão de incubação (PBS 1 x contendo 0,5 % de leite desnatado em pó e 0,03 % de Tween 20).

## 5.7. ENSAIO DE BLOQUEIO DE INFECÇÃO

Primeiramente,  $5 \times 10^4$  células da linhagem LLC-MK2 foram plaqueadas 24 horas antes da realização dos experimentos e em lamínulas de 13 mm. Também,  $5 \times 10^5$  formas tripomastigotas (TCT) foram incubadas com  $5 \times 10^8$  bacteriófagos expressando o peptídeo T2, com o peptídeo sintético T2<sup>3</sup> e com o peptídeo ScT2<sup>4</sup> nas concentrações de 5 µM, 25 µM e 50 µM, assim como com o peptídeo ScT3 na concentração de 25 µM, por 1 h. Os parasitos foram lavados duas vezes com RPMI sem soro para retirar os fagos e peptídeos não ligantes, e recuperados por centrifugação em 5.000 x g, 5 min e 4 °C.

---

<sup>3</sup> Os peptídeos sintéticos foram gentilmente produzidos em colaboração com o professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

<sup>4</sup> Os peptídeos ScT2 e ScT3 referem-se aos peptídeos Scrambled de T2 e T3, respectivamente. Peptídeos Scrambled são aqueles que possuem a mesma composição de aminoácidos do peptídeo de referência, porém organizados com uma sequência diferente.

Em seguida, monocamadas de células LLC-MK2 foram infectadas por 24 h com os fagos e por 2 h com os fagos e com os peptídeos sintéticos. Nesse último caso, as células infectadas foram avaliadas 12 h pós infecção.

Por fim, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 min e lavadas com PBS 1 x. As lamínulas foram coradas com DAPI (1 µg/ml) por 10 min no escuro, as lâminas foram montadas utilizando glicerina 1 % em PBS e o número de células infectadas e de amastigotas intracelulares foi determinado utilizando microscópio de fluorescência (BX51 Olympus).

O ensaio também foi realizado com células da linhagem LLC-MK2 plaqueadas previamente, e incubadas por 1 h com as mesmas concentrações dos peptídeos utilizados. As células foram infectadas com  $5 \times 10^5$  formas tripomastigotas por 2 h, sendo que o número de células infectadas foi avaliado 12 h pós infecção após coloração com DAPI, como descrito acima.

## **5.8. ENSAIO DE VIABILIDADE *IN VITRO***

Uma quantidade de  $1 \times 10^5$  células da linhagem LLC-MK2, preparadas 24 h antes da realização dos experimentos, e  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas foram plaqueadas em placa de 96 poços. Uma vez plaqueados, os parasitos e as células foram incubados com o peptídeo sintético T2 e com o peptídeo ScT2 nas concentrações de 5 µM, 25 µM e 50 µM, e com o peptídeo ScT3 na concentração de 25 µM.

O tempo de exposição dos parasitos aos peptídeos foi de 3 h e 5 h, enquanto que para as células, o tempo de 24 h e 48 h foi utilizado. A viabilidade celular foi determinada utilizando o reagente Resazurina (Alamar Blue™) por 2 h, seguindo as orientações do fabricante (Sigma-Aldrich). Posteriormente, a absorbância das placas foi medida em leitor de placa em 595 nm (BONNIER et al., 2015).

## **5.9. EXPERIMENTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados com o auxílio do software GraphPad Prism 7, sendo que as análises estatísticas foram consideradas significantes com  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. SELEÇÃO DE CLONES QUE INTERAGEM COM A SUPERFÍCIE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

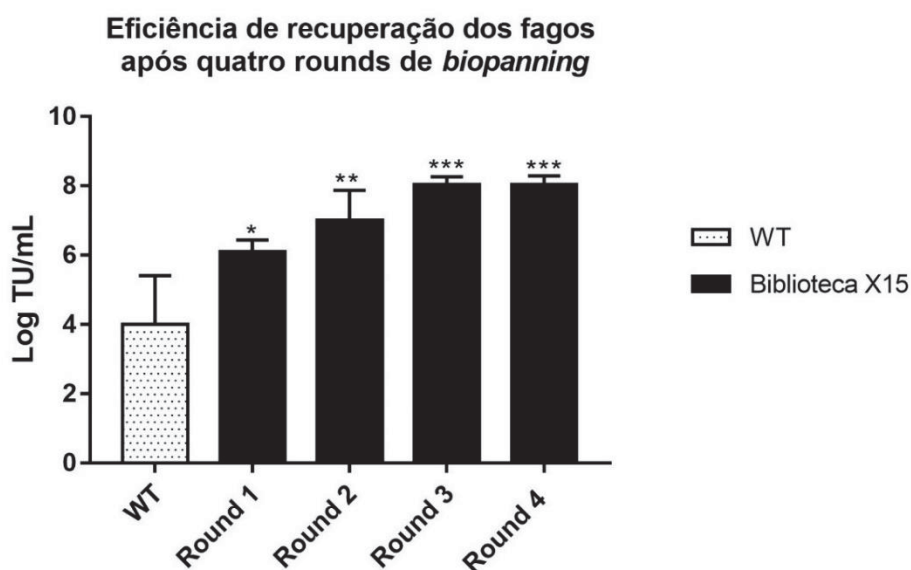
Inicialmente, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram produzidas para a realização dos ciclos de seleção por *Phage display* através da infecção de formas tripomastigotas metacíclicas em monocamadas de células LLC-MK2. *T. cruzi* expressa genes de forma diferencial ao longo do ciclo de vida, de maneira que diferentes formas evolutivas podem expressar diferentes proteínas de superfície (LI et al., 2016). Dessa forma, considerando-se que formas amastigotas podem estar presentes em menor proporção durante o cultivo celular para obtenção das formas tripomastigotas, nós realizamos os ciclos de seleção com o maior nível de pureza possível das formas de interesse (Tabela 2).

**Tabela 2:** Porcentagem de formas tripomastigotas utilizadas em cada ciclo de *biopanning*

| Round | Porcentagem de tripomastigotas (%) |
|-------|------------------------------------|
| 1     | 94                                 |
| 2     | 96                                 |
| 3     | 94                                 |
| 4     | 98                                 |

Fonte: A autora (2019).

Para a seleção de bacteriófagos da biblioteca X15 (composta por peptídeos contendo 15 aminoácidos aleatórios) que se ligam à superfície de formas tripomastigotas, quatro ciclos de *biopanning* foram feitos. Em seguida, para avaliar a eficiência de recuperação, os fagos selecionados foram titulados a cada round (Figura 7).



**Figura 7:** Eficiência de recuperação dos clones de bacteriófagos ligantes a superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após quatro rounds de seleção.  $1 \times 10^7$  parasitos foram incubados com  $10^{10}$  TU de bacteriófagos da biblioteca X15. Após 1 h, os fagos não ligantes foram removidos e os fagos selecionados foram titulados em placas de ágar contendo 20  $\mu\text{g/mL}$  de tetraciclina.

Considerando o bacteriófago selvagem (WT), o rendimento médio de recuperação dos fagos foi de  $7,1 \times 10^4$ , enquanto que para a biblioteca X15, no primeiro round, o rendimento médio foi de  $1,5 \times 10^5$ , e no último round foi de  $5,7 \times 10^7$ .

Ao final, houve uma recuperação de aproximadamente 802 vezes mais fagos da biblioteca em relação ao fago selvagem, demonstrando que a maior eficiência de recuperação é provavelmente devido à presença dos peptídeos expostos na superfície do fago e não em função de proteínas próprias do bacteriófago.

É possível concluir que houve um enriquecimento dos fagos ligantes ao longo dos ciclos de seleção, como esperado (BROCKMANN, 2012; HOEN et al., 2012; MIMMI et al., 2019).

## 6.2. IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LIGANTES E ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

### 6.2.1. Determinação da sequência dos peptídeos selecionados e identificação de proteínas miméticas

Para descobrirmos a sequência dos peptídeos expressos na superfície dos bacteriófagos após os quatro ciclos de seleção, colônias isoladas de *E. coli* K91

infectadas foram aleatoriamente escolhidas e a região gênica pVIII<sub>R</sub>, que é a região correspondente à proteína pVIII recombinante do fago, foi amplificada duas vezes por PCR, com posterior sequenciamento seguindo a tecnologia de Sanger. Nós sequenciamos com sucesso 12 clones, sendo 9 deles não redundantes (Tabela 4), e apenas os peptídeos denominados de T3 e T9 foram observados repetidamente. Além disso, as sequências obtidas dos peptídeos se mostraram pouco similares quando comparadas.

**Tabela 3:** Frequência e porcentagem apresentada pelos peptídeos selecionados após o processo de sequenciamento. Um total de 12 sequências de peptídeos foram obtidas por meio do sequenciamento da região gênica de pVIII dos fagos selecionados.

| Peptídeo     | Frequência | Porcentagem |
|--------------|------------|-------------|
| T1           | 1/12       | 8,33        |
| T2           | 1/12       | 8,33        |
| T3           | 3/12       | 25          |
| T4           | 1/12       | 8,33        |
| T5           | 1/12       | 8,33        |
| T6           | 1/12       | 8,33        |
| T7           | 1/12       | 8,33        |
| T8           | 1/12       | 8,33        |
| T9           | 2/12       | 16,6        |
| <b>Total</b> | <b>12</b>  | <b>100</b>  |

Fonte: A autora (2019).

Uma vez que as sequências de aminoácidos dos peptídeos foram determinadas, nós utilizamos a ferramenta de bioinformática BLASTp para encontrar proteínas do hospedeiro vertebrado que possuam sequências de aminoácidos similares aos peptídeos selecionados, baseando-se nos dados de proteínas humanas

(human (taxid:9606)) (Quadro 1). A interpretação dos dados nos fornece uma base para prever possíveis interações que o protozoário pode realizar com o hospedeiro.

**Quadro 1:** Possíveis proteínas humanas que mimetizam a interação dos peptídeos selecionados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Os dados foram fornecidos pela ferramenta de bioinformática BLASTp. Por questões de confidencialidade, as sequências dos peptídeos não serão expostas completamente, sendo X qualquer aminoácido.

| Peptídeo | Sequência         | Descrição                                   |
|----------|-------------------|---|
| T1       | RQMXXXXXXXXXXXXX  | Immunoglobulin heavy chain variable region  |
| T2       | TTAXXXXXXXXXXXXXX | Immunoglobulin heavy chain V region         |
| T3       | AQPXXXXXXXXXXXXX  | Immunoglobulin heavy chain junction region  |
| T4       | MTAXXXXXXXXXXXXXX | T cell receptor beta chain                  |
| T5       | PILXXXXXXXXXXXXX  | Mucin-16 isoform X12                        |
| T6       | CNKXXXXXXXXXXXXX  | Immunoglobulin light chain junction region_ |
| T7       | LKYXXXXXXXXXXXXX  | Immunoglobulin light chain junction region_ |
| T8       | MTAXXXXXXXXXXXXXX | Phospholipase A2                            |
| T9       | MTAXXXXXXXXXXXXXX | Myosin light chain kinase                   |
|          |                   | Immunoglobulin heavy chain junction region  |

Fonte: A autora (2019).

Analisando os dados fornecidos pelo BLASTp, observa-se que a maior parte dos resultados remete para as imunoglobulinas, o que pode ser um indício de interações que o parasito realiza para evadir-se do sistema imunológico e perpetuar a infecção no hospedeiro ou um mecanismo de defesa associado ao hospedeiro vertebrado na tentativa de eliminar o parasitismo. Outras proteínas, como fosfolipase A2 e miosina quinase, foram preditas, sendo que há estudos que especulam o envolvimento de tais proteínas com o parasito, como veremos posteriormente.

Além das predições das proteínas relatadas no Quadro 1, os dados referentes aos parâmetros dos alinhamentos gerados pelo BLASTp podem ser vistos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Parâmetros fornecidos pela ferramenta de bioinformática BLASTp. Os alinhamentos foram obtidos para os peptídeos selecionados utilizando dados de proteínas humanas.

| Peptídeo | Query Cover (%) | Identidade (%) | <i>e-value</i> | Nº de acesso   |
|----------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| T1       | 73              | 63,64          | 14             | ABI35452.1     |
| T2       | 66              | 64,29          | 4,9            | AMK70134.1     |
| T3       | 60              | 88,89          | 13             | MCB56830.1     |
|          | 86              | 56,25          | 4,9            | ABO26961.1     |
| T4       | 100             | 66,67          | 4,9            | XP_016882989.1 |
| T5       | 73              | 72,73          | 0,67           | MCD10740.1     |
| T6       | 46              | 85,71          | 40             | MCA54479.1     |
| T7       | 53              | 87,50          | 20             | EAW92533.1     |
| T8       | 53              | 87,50          | 4,8            | 2YR3_A         |
| T9       | 46              | 100            | 16             | MOK42744.1     |

Fonte: A autora (2019).

Considerando os dados obtidos, é possível notar que o *e-value*, que é uma medida da confiabilidade do alinhamento e representa a probabilidade de o resultado fornecido ter sido encontrado ao acaso (VANDERWEELE e DING, 2017), foi alto para o alinhamento referente às sequências, principalmente dos peptídeos T6 e T7. O alto valor de *e-value* já era esperado em virtude de as sequências dos peptídeos submetidas ao alinhamento serem muito curtas, mas o ocorrido não afeta a viabilidade do estudo.

Ainda que mediante a valores elevados de *e-value*, consideramos os dados fornecidos pela ferramenta de bioinformática pela similaridade da respectiva proteína humana predita com a predição fornecida para os outros alinhamentos de *e-value* de menor valor e/ou pela molécula predita ter sido descrita na literatura como tendo relação com processos de invasão ou sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado.




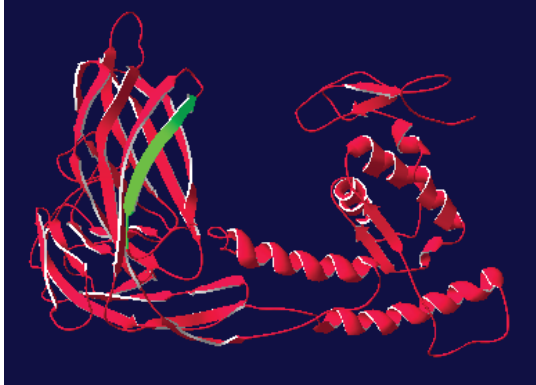
### **6.2.2. Localização das sequências peptídicas selecionadas nas proteínas preditas**

Uma vez que as sequências dos peptídeos selecionados foram descobertas e que encontramos proteínas humanas que podem mimetizar a interação que esses peptídeos realizam com o parasito, nossa próxima análise de bioinformática foi feita para avaliar a localização dos resíduos de aminoácidos cobertos pelo alinhamento dos peptídeos selecionados nas estruturas 3D das proteínas que foram preditas pelo BLASTp.

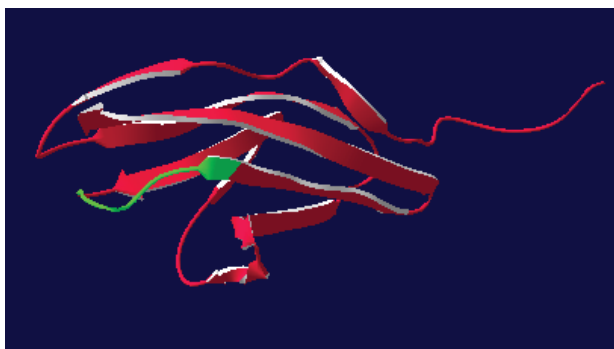
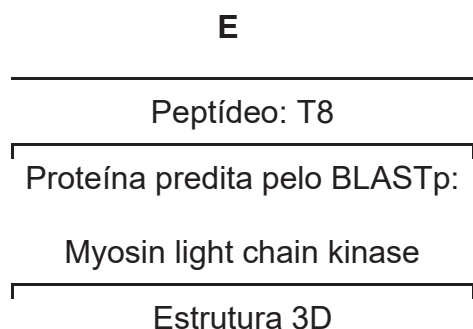
Com a determinação das estruturas 3D das proteínas, nosso objetivo foi analisar se as regiões cobertas pelo alinhamento das proteínas humanas estavam expostas o suficiente para que a proteína predita pudesse ser considerada como um possível candidato que pode realizar interações reais com o parasito. Para isso, utilizamos a ferramenta online Phyre2 para obtermos as estruturas 3D das proteínas preditas e a ferramenta Swiss PDB Viewer para visualização e edição das estruturas.

Uma observação que vale ser ressaltada é que a ferramenta Phyre2 apresenta um limite mínimo e máximo de 30 e 3.500 resíduos de aminoácidos para predição, respectivamente. Levando em consideração essa limitação da ferramenta, as predições das estruturas 3D foram obtidas com sucesso para as proteínas referentes ao alinhamento dos peptídeos T1, T2, T3, T7 e T8. Contudo, não foi possível obter o resultado para a proteína referente ao peptídeo T4 em virtude de a sequência proteica ser muito longa (11.159 resíduos de aminoácidos), assim como a estrutura 3D para as proteínas correspondentes aos peptídeos T3 (uma das possibilidades avaliadas), T5, T6 e T9 foi inviabilizada pelo fato de as sequências possuírem tamanho menor que o mínimo suportado pela ferramenta.

Na Figura 8 estão representadas as estruturas proteicas 3D obtidas. As regiões das proteínas correspondentes com o alinhamento dos peptídeos estão marcadas em verde e as regiões não relacionadas estão representadas pela cor rosa.

| A   | B  |
|---|--|
| Peptídeo: T1  | Peptídeo: T2   |
| Proteína predita pelo BLASTp:<br>Immunoglobulin heavy chain variable region         | Proteína predita pelo BLASTp:<br>Immunoglobulin heavy chain V region                 |
| Estrutura 3D  | Estrutura 3D   |
|   |   |
| C   | D  |
| Peptídeo: T3  | Peptídeo: T7   |
| Proteína predita pelo BLASTp:<br>T cell receptor beta chain                         | Proteína predita pelo BLASTp:<br>Phospholipase A2                                    |
| Estrutura 3D  | Estrutura 3D   |
|  |  |

**Figura 8:** Predição da estrutura 3D das proteínas humanas mimetizadas pelos peptídeos selecionados. A predição foi realizada utilizando a ferramenta Phyre2 e visualizadas utilizando o programa Swiss PDB Viewer. As sequências proteicas cobertas pelo alinhamento estão marcadas em verde, os sítios de ligação ao antígeno das imunoglobulinas estão marcados em azul (quando os dados de anotação eram disponíveis), e as regiões não relacionadas estão representadas em rosa. Predições referentes aos peptídeos T1 (A), T2 (B), T3 (C) e T7 (D).



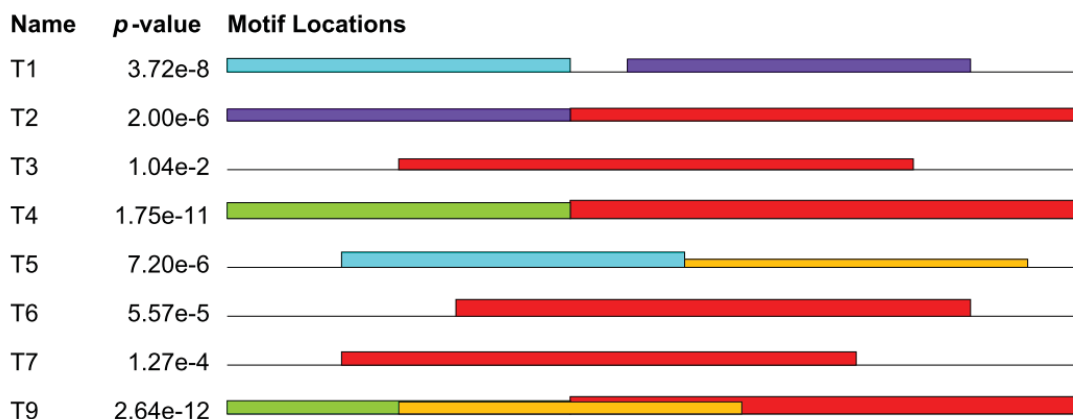
**Figura 8 (continuação):** Predição da estrutura 3D das proteínas humanas mimetizadas pelos peptídeos selecionados.

A predição foi realizada utilizando a ferramenta Phyre2 e visualizadas utilizando o programa Swiss PDB Viewer. As sequências proteicas cobertas pelo alinhamento estão marcadas em verde, os sítios de ligação ao antígeno das imunoglobulinas estão marcados em azul (quando os dados de anotação eram disponíveis), e as regiões não relacionadas estão representadas em rosa. **(E)** Predição referente ao peptídeo T8.

### 6.2.3. Determinação de domínios conservados entre os peptídeos selecionados

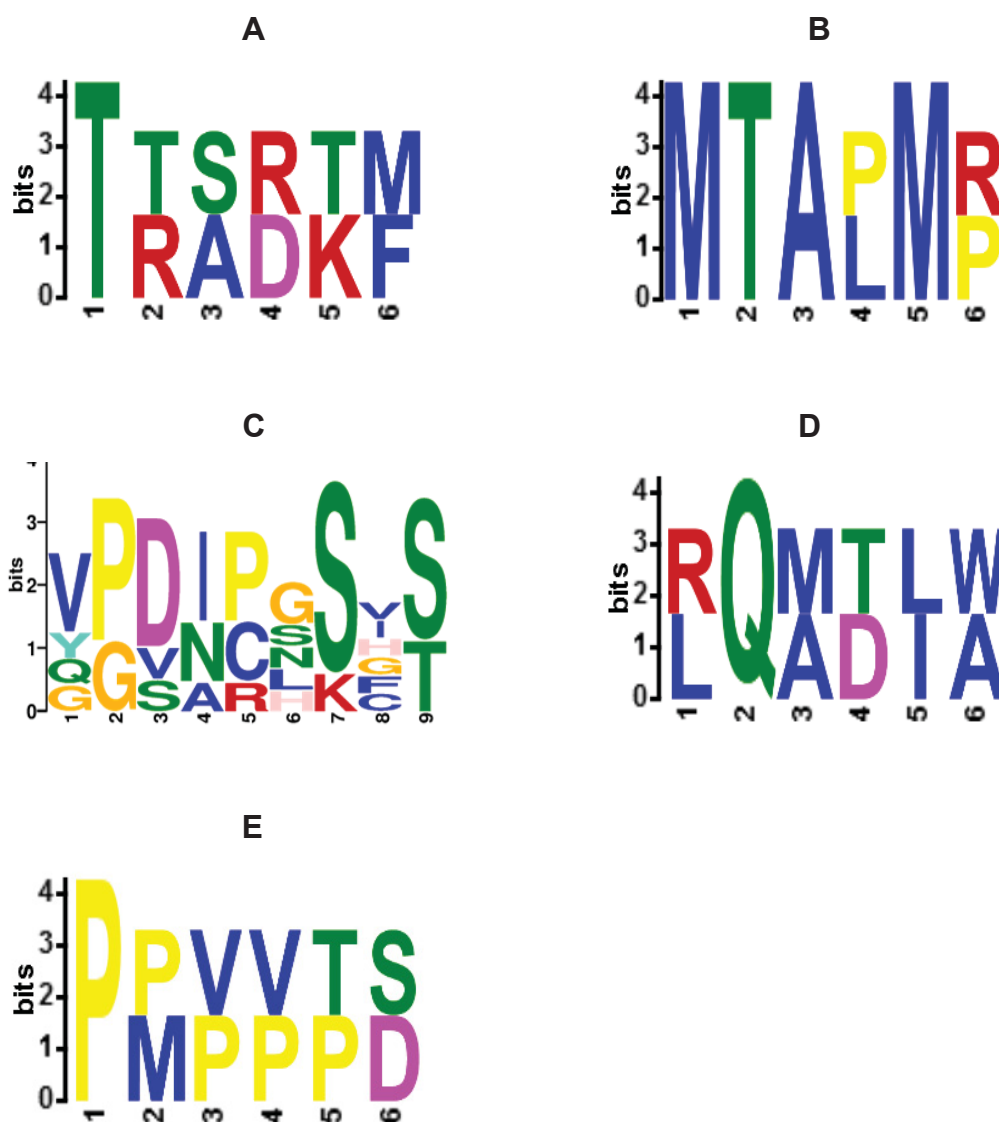
Posteriormente, a ferramenta de bioinformática MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) foi utilizada para encontrarmos domínios semelhantes nos diferentes peptídeos selecionados, que poderiam constituir regiões importantes de interação com o parasito. O peptídeo T8 foi excluído da análise pela similaridade com os peptídeos T4 e T9, o que prejudicava o encontro de domínios pela ferramenta.

Ao total, 5 domínios foram preditos (Figura 9). O domínio XQXXXW, representado em azul, foi encontrado nos peptídeos T1 e T5, enquanto o domínio representado em roxo, TXXXKX, foi observado nos peptídeos T1 e T2. Por sua vez, as colorações em vermelho, verde e laranja determinaram os domínios XXXXXSXX, MTAXXX e PXXXXX, respectivamente, e foram encontrados nos peptídeos T2, T3, T4, T6, T7 e T9; T4 e T9; e T5 e T9, nessa ordem. A posição de cada aminoácido (conservado ou variante) nos domínios encontrados pode ser visto na Figura 10.



**Figura 9:** Domínios conservados entre os peptídeos selecionados.

A predição foi realizada utilizando a ferramenta de bioinformática MEME. As cores azul, roxo, vermelho, verde e laranja representam os domínios XQXXXW, TXXXXX, XXXXXXSXX, MTAXXX e PXXXXX, respectivamente.



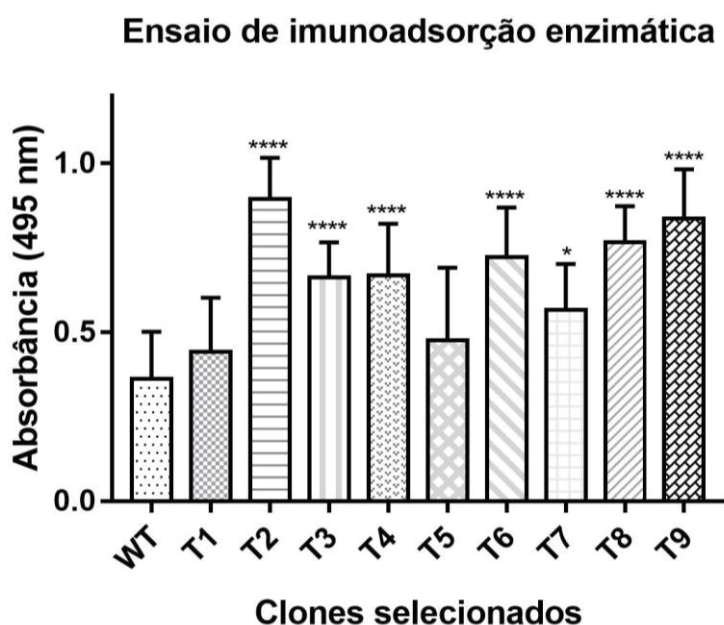
**Figura 10:** Representação dos domínios encontrados.

A representação gráfica dos domínios foi feita utilizando o formato WebLogo.

(Fig. 10, continuação) Após alinhamento das seqüências de interesse, os aminoácidos conservados e os variantes dos domínios encontrados são mostrados em suas respectivas posições. (A) Domínio roxo. (B) Domínio verde. (C) Domínio vermelho. (D) Domínio azul e (E) domínio laranja.

### 6.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS

Subsequente ao processo de seleção e análises de bioinformática, os clones de bacteriófagos selecionados foram testados quanto a capacidade de ligação através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Conforme mostrado na figura 11, sete clones apresentaram ligação estatisticamente significativa em relação à ligação observada para o bacteriófago selvagem (WT), sendo que destes, seis demonstraram maior reatividade.



**Figura 11:** Avaliação da capacidade de ligação dos clones selecionados através do Ensaio de Imunoadsorção enzimática (ELISA).

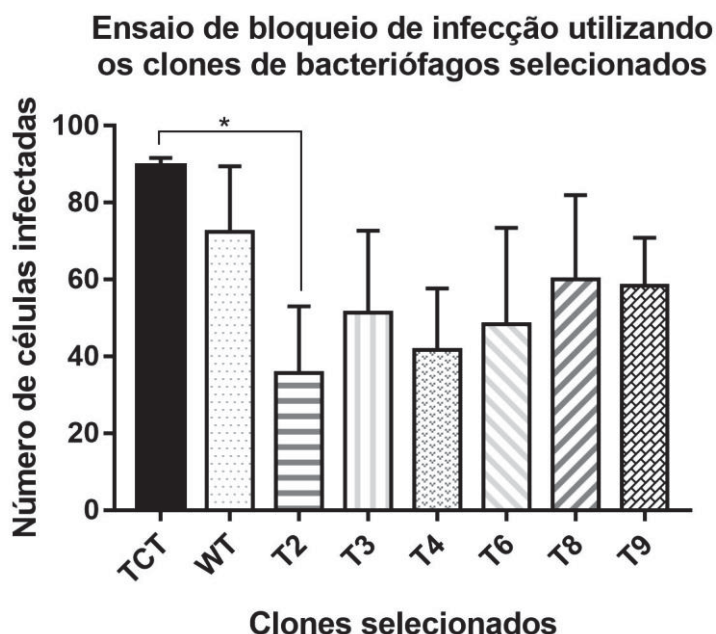
$1 \times 10^6$  formas tripomastigotas foram expostas a  $10^9$  TU de bacteriófagos referentes aos clones selecionados, por 1 h. Posteriormente, a absorvância foi medida a 495 nm após 1 h de incubação com anticorpos anti-M13.

Dentre os clones de bacteriófagos selecionados, o clone que expressa o peptídeo denominado T2 demonstrou maior reatividade, sendo 2,5 vezes maior em relação ao bacteriófago selvagem (WT). Na seqüência, os fagos expressando os peptídeos T9, T8, T6, T4, T3 e T7 apresentaram 2,3, 2,13, 2, 1,86, 1,83 e 1,56 vezes maior capacidade de ligação quando comparados com o controle negativo.

#### 6.4. ENSAIO DE BLOQUEIO DE INFECÇÃO

Após verificação da capacidade de ligação dos clones de bacteriófagos testados, nosso próximo passo foi avaliar se os clones com maiores reatividades (Fig. 11) poderiam apresentar outra atividade, além da de ligação, em relação aos parasitos, como a interferência no processo de infectividade.

Inicialmente, o número de células da linhagem LLC-MK2 infectadas foi avaliado após 24 h de infecção com as formas tripomastigotas que foram pré-incubadas com os clones de fagos expressando os peptídeos T2, T3, T4, T6, T8 e T9 (Figura 12).



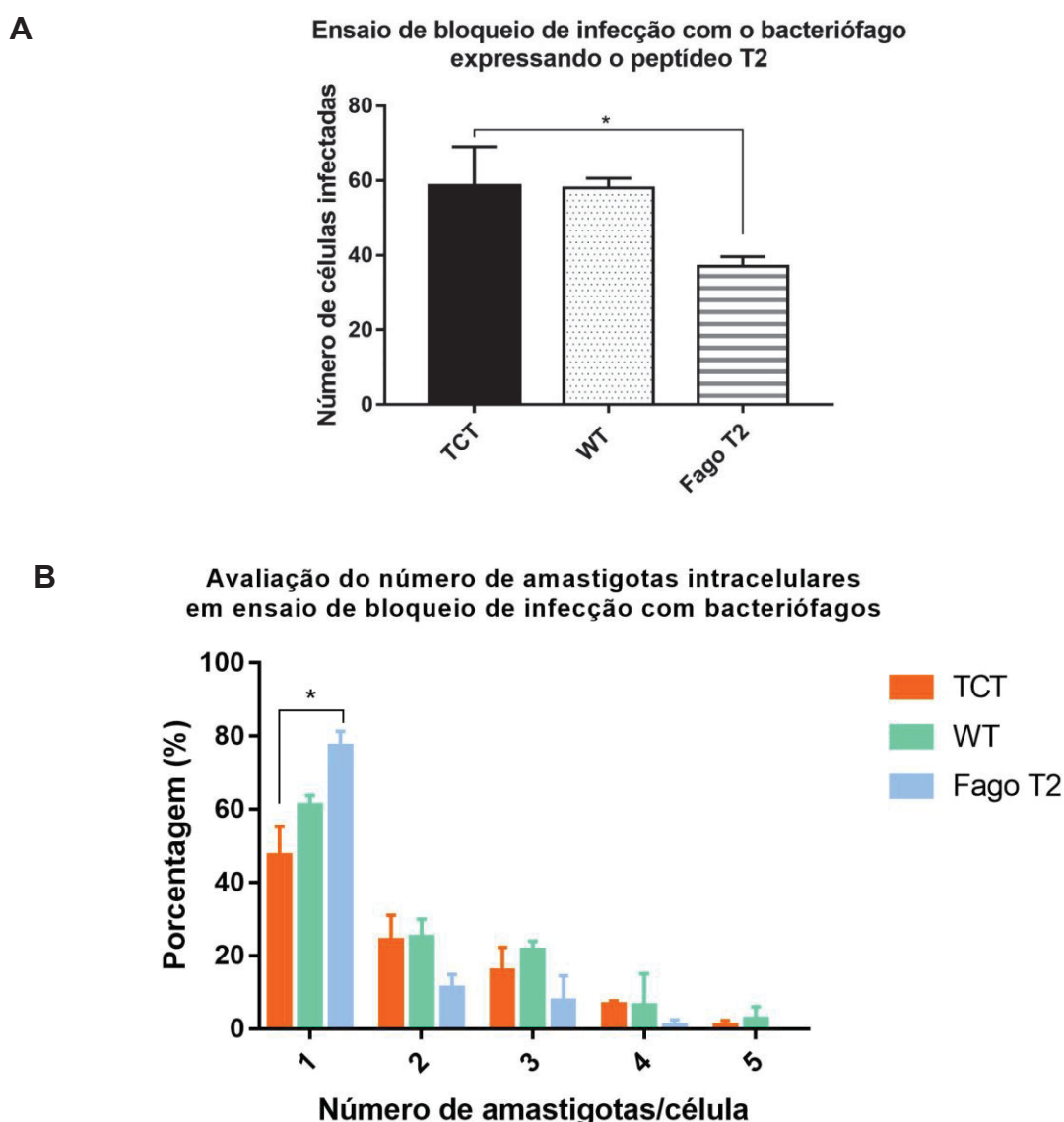
**Figura 12:** Ensaio de bloqueio de infecção utilizando os clones de bacteriófagos selecionados. Formas tripomastigotas foram incubadas com os clones de bacteriófagos selecionados por 1 h. Posteriormente, monocamadas de células LLC-MK2 foram infectadas (razão 10:1 parasitos/célula) por um período de 24 h, sendo que o número de células infectadas foi determinado em microscópio de fluorescência após coloração com DAPI. TCT corresponde às formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular que não foram incubadas com fagos; WT refere-se ao bacteriófago que não é modificado geneticamente para expressar peptídeos recombinantes em sua superfície e TX (em que X é um número) é o bacteriófago que expressa o peptídeo designado pelo número que lhe foi atribuído.

O único clone de bacteriófago que demonstrou redução estatisticamente significativa foi o clone expressando o peptídeo T2, que reduziu a taxa de infecção das formas tripomastigotas em 2,5 vezes.

Assim, nós prosseguimos os nossos ensaios com o clone de bacteriófago que expressa o peptídeo T2, e também passamos a utilizar o peptídeo T2 sintético.

Utilizamos como controle negativo o scrambled do peptídeo T2 e do peptídeo T3 para avaliarmos se a interação do peptídeo com o parasito é domínio específico.

Li et al. (2016) já relataram que em períodos de 24 h, as formas amastigotas intracelulares já estão em processo de replicação. Dessa forma, para associarmos o número de amastigotas intracelulares com o número de formas tripomastigotas que infectaram as células LLC-MK2, o ensaio de bloqueio de infecção seguinte foi realizado novamente com o clone de bacteriófago expressando o peptídeo T2, porém, nessa ocasião, nós reduzimos o tempo de infecção de 24 h para 2 h e avaliamos o número de células infectadas (Fig. 13A) e o número de amastigotas intracelulares (Fig. 13B) após 12 h.

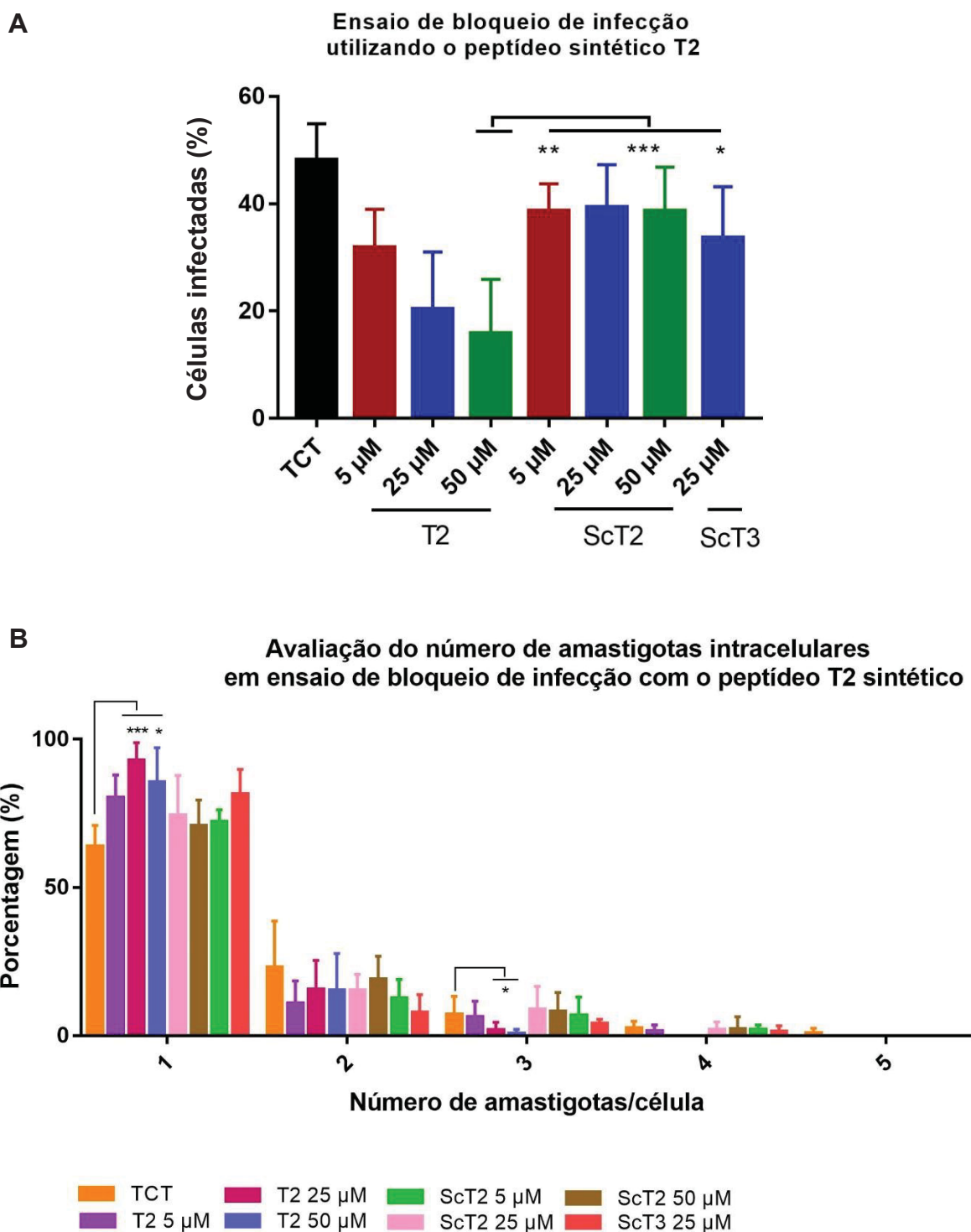


**Figura 13:** Ensaio de bloqueio de infecção utilizando o clone de bacteriófago T2.

**(Fig. 13, continuação)** Formas tripomastigotas foram incubadas com o clone de bacteriófago expressando o peptídeo T2 por 1 h. Posteriormente, monocamadas de células LLC-MK2 foram infectadas por um período de 2 h, sendo que o número de células infectadas **(A)** foi determinado em microscópio de fluorescência 12 hpi após coloração por DAPI e o número de amastigotas intracelulares **(B)** foi determinado em microscópio de fluorescência 12 hpi após coloração por DAPI. TCT corresponde às formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular que não foram incubados com fagos; WT refere-se ao bacteriófago que não é modificado geneticamente para expressar peptídeos recombinantes em sua superfície e Fago T2 é o bacteriófago que expressa o peptídeo T2. TCT corresponde às formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular que não foram incubados com fagos; WT refere-se ao bacteriófago que não é modificado geneticamente para expressar peptídeos recombinantes em sua superfície e Fago T2 é o bacteriófago que expressa o peptídeo T2.

O bacteriófago expressando o peptídeo T2 reduziu as taxas de infecção das formas tripomastigotas em 1,6 vezes, enquanto nenhuma diferença foi observada nas taxas de infecção de formas tripomastigotas pré-incubadas com o bacteriófago selvagem. Também observamos que das células infectadas, a porcentagem de 1 (um) amastigota por célula foi maior quando consideramos o fago T2.

A fim de obtermos resultados mais conclusivos sobre a influência do peptídeo T2 no processo de infecção, e para descartar a influência de outras proteínas associadas ao bacteriófago, nós utilizamos o peptídeo T2 sintético em ensaios de bloqueio de infecção nas mesmas condições descritas. O número de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares pode ser visto nas figuras 14A e 14B, respectivamente.



**Figura 14:** Ensaio de bloqueio de infecção utilizando o peptídeo sintético T2.

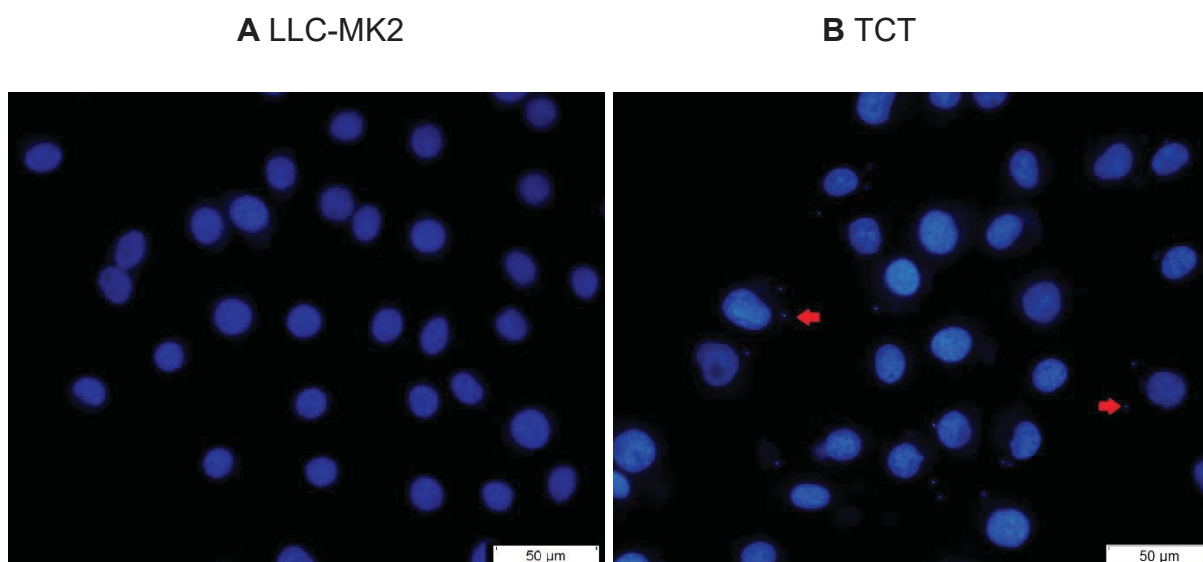
Formas tripomastigotas foram incubadas com o peptídeo sintético T2 nas concentrações de 5 μM, 25 μM e 50 μM por 1 h. Posteriormente, monocamadas de células LLC-MK2 foram infectadas por um período de 2 h, sendo que o número de células infectadas (A) e o número de amastigotas intracelulares (B) foi determinado em microscópio de fluorescência 12 hpi após coloração por DAPI. TCT, formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular que não receberam nenhum tratamento; T2 corresponde ao peptídeo sintético cuja sequência foi determinada por *Phage display*, ScT2 e ScT3 são peptídeos controles negativos de ligação, que correspondem a peptídeos na forma embaralhada (scrambled) dos peptídeos T2 e T3, respectivamente.

A taxa de infecção dos parasitos foi reduzida em 1,8; 2,4 e 3 vezes quando as formas tripomastigotas foram tratadas com 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M do peptídeo T2, em comparação com a infecção realizada com as formas tripomastigotas não submetidas a nenhum tratamento. Uma redução na taxa de infecção de 1,2 vezes foi observada para os parasitos tratados em todas as concentrações do peptídeo ScT2, assim como uma redução de 1,4 vezes foi obtida quando utilizamos o peptídeo ScT3.

Nenhuma diferença estatística foi observada nas taxas de infecção entre os tratamentos com o peptídeo T2 nas concentrações de 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. Essas taxas de infecção foram menores também em comparação com as taxas observadas quando os parasitos eram tratados com o scrambled T2 e T3, como relatado acima.

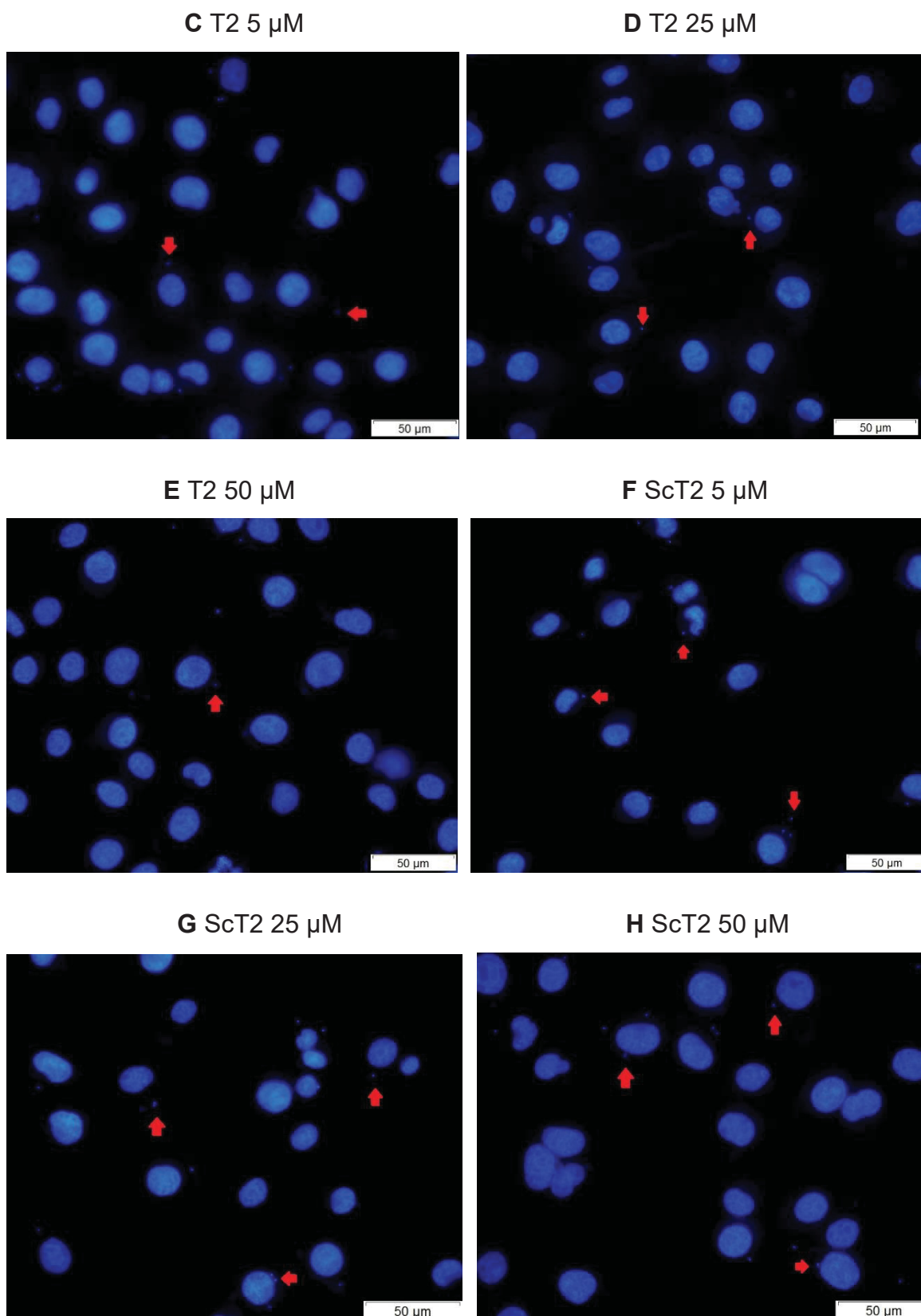
Com relação ao número de amastigotas intracelulares, observamos que uma maior porcentagem das células infectadas com os parasitos tratados com 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M do peptídeo T2 apresentou um único amastigota, enquanto que uma redução de quantidades maiores de amastigotas intracelulares (3) também pode ser visualizada nas mesmas concentrações do peptídeo T2 utilizadas.

A figura 15 ilustra o processo de infecção quando os parasitos eram pré-incubados com os peptídeos sintéticos, em que podemos perceber visualmente a redução das taxas de infecção.



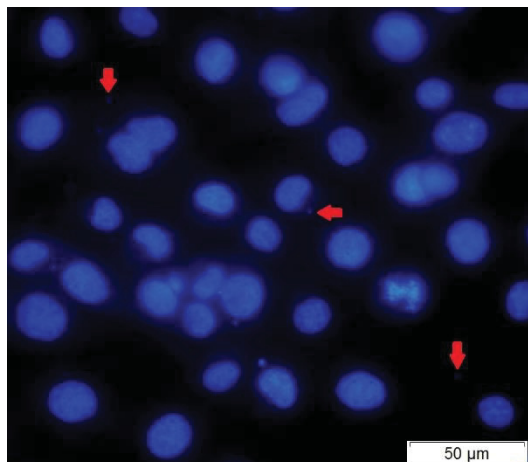
**Figura 15:** Padrão de infecção de células LLC-MK2 em ensaios de bloqueio de infecção utilizando o peptídeo sintético T2.

(A) Células da linhagem LLC-MK2 sem infecção e (B) Células infectadas com formas tripomastigotas que não foram pré-incubadas com peptídeos sintéticos. As formas amastigotas intracelulares são mostradas em estruturas semelhantes àquelas apontadas pelas setas vermelhas.



**Figura 15 (continuação):** Padrão de infecção de células LLC-MK2 em ensaios de bloqueio de infecção utilizando o peptídeo sintético T2.

Células da linhagem LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas que foram pré-incubadas com 5 μM (C), 25 μM (D) e 50 μM (E) do peptídeo sintético T2 e 5 μM (F), 25 μM (G) e 50 μM (H) do peptídeo sintético Scrambled ScT2. As formas amastigotas intracelulares são mostradas em estruturas semelhantes àquelas apontadas pelas setas vermelhas.

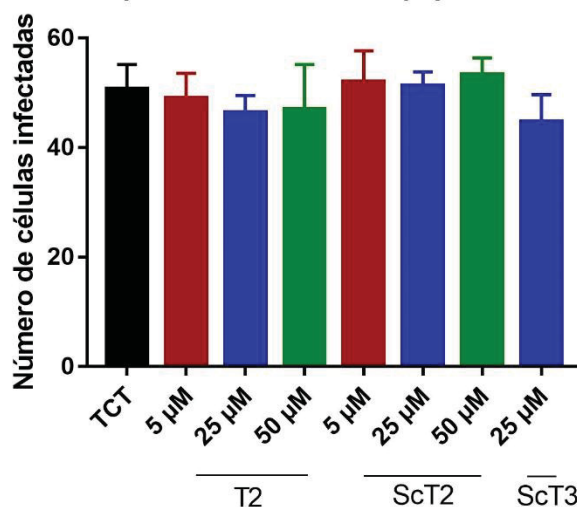
I ScT3 25  $\mu$ M

**Figura 15 (continuação):** Padrão de infecção de células LLC-MK2 em ensaios de bloqueio de infecção utilizando o peptídeo sintético T2.

Células da linhagem LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas que foram pré-incubadas com 25  $\mu$ M (I) do peptídeo sintético Scrambled ScT3. As formas amastigotas intracelulares são mostradas em estruturas semelhantes às aquelas apontadas pelas setas vermelhas.

Também, para verificarmos se o peptídeo T2 poderia interferir na infectividade do parasito através de interações com células de mamíferos e, assim, bloquear sítios importantes de interação com o protozoário, nós pré-incubamos células da linhagem LLC-MK2 com o peptídeo. Em seguida, as células foram infectadas por 2 h com os parasitos. Doze horas pós-infecção, nós avaliamos o número de células infectadas (Figura 16). Observamos que não houve diferença nas taxas de infecção das formas tripomastigotas, indicando que o peptídeo tem interação específica com o parasito, ainda que mais ensaios sejam necessários para a confirmação de nossos resultados.

### Ensaio de bloqueio de infecção em células LLC-MK2 pré-incubadas com o peptídeo T2

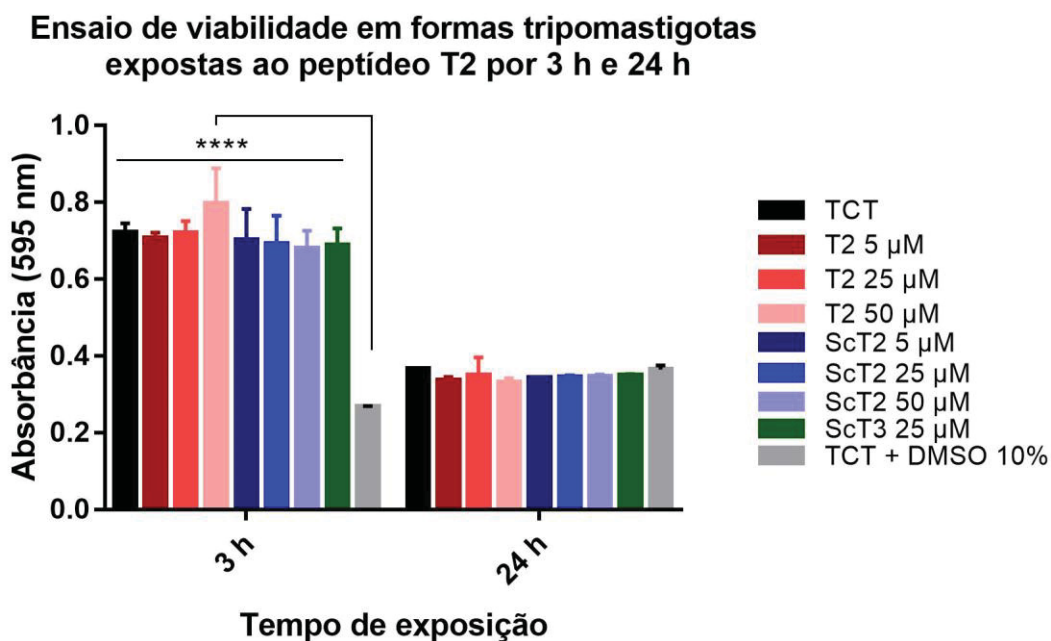


**Figura 16:** Ensaio de bloqueio de infecção em células LLC-MK2 utilizando o peptídeo sintético T2.  $5 \times 10^4$  células da linhagem LLC-MK2 foram pré-incubadas com o peptídeo sintético T2 nas concentrações de 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M por 1 h. Posteriormente, a monocamada celular foi infectada com  $5 \times 10^5$  formas tripomastigotas por um período de 2 h, sendo que o número de células infectadas foi determinado em microscópio de fluorescência 12 hpi após coloração por DAPI. TCT, formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular que não receberam nenhum tratamento; T2 corresponde ao peptídeo sintético cuja sequência foi determinada por *Phage display*, ScT2 e ScT3 são peptídeos controles negativos de ligação, que correspondem a peptídeos na forma embaralhada (scrambled) dos peptídeos T2 e T3, respectivamente

## 6.5. ENSAIO DE VIABILIDADE *IN VITRO*

Por fim, uma vez que observamos uma redução nas taxas de infecção quando as formas tripomastigotas foram tratadas com o peptídeo T2, analisamos se esse comportamento poderia ser explicado pelo fato de o peptídeo afetar a viabilidade celular. De forma preliminar, testamos se o peptídeo T2 poderia exercer atividade citotóxica para os parasitos e para as células hospedeiras utilizando o reagente Resazurina (Alamar Blue™), que é captado por células viáveis e reduzido a resorufina (coloração rosa).

Para esse ensaio, formas tripomastigotas foram submetidas ao tratamento com o peptídeo T2 por 3 h e 24 h (Figura 17), nas concentrações de 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M.



**Figura 17:** Ensaio de viabilidade em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

O ensaio foi feito utilizando-se as concentrações de 5 µM, 25 µM e 50 µM do peptídeo T2, e avaliado por 3 h e 24 h de exposição ao tratamento. Para a detecção da viabilidade, o reagente Alamar Blue™ foi utilizado e a absorbância foi medida a 595 nm. TCT, formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular que não receberam nenhum tratamento; T2 corresponde ao peptídeo sintético cuja sequência foi determinada por *Phage display*, ScT2 e ScT3 são peptídeos controles negativos de ligação, que correspondem a peptídeos na forma embaralhada (scrambled) dos peptídeos T2 e T3, respectivamente. DMSO 10% foi utilizado como uma condição de controle de redução de viabilidade celular.

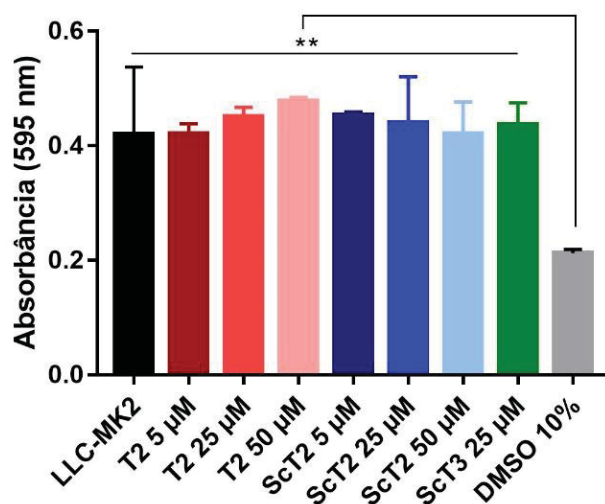
Nos dois tempos avaliados de exposição dos parasitos ao peptídeo T2, não houve diferença estatística entre os parasitos que foram tratados com as diferentes concentrações do peptídeo tanto em relação às formas tripomastigotas que não receberam nenhum tratamento, assim como em relação ao grupo de controle negativo. Nenhuma diferença de viabilidade foi observada entre os grupos de parasitos que foram tratados com as diferentes concentrações utilizadas do peptídeo.

Ainda que a viabilidade dos parasitos tenha reduzido quando consideramos o tempo de exposição de 24 horas em comparação com a exposição de 3 h, percebemos que os parasitos que não foram tratados também apresentaram viabilidade reduzida. Dessa forma, não foi possível associar a redução da viabilidade com uma possível atividade tóxica do peptídeo T2.

Também avaliamos o efeito do peptídeo T2 em células da linhagem LLC-MK2 que foram submetidas ao tratamento por 24 h (Figura 18A) e 48 h (Figura 18B) e nas mesmas concentrações anteriormente citadas.

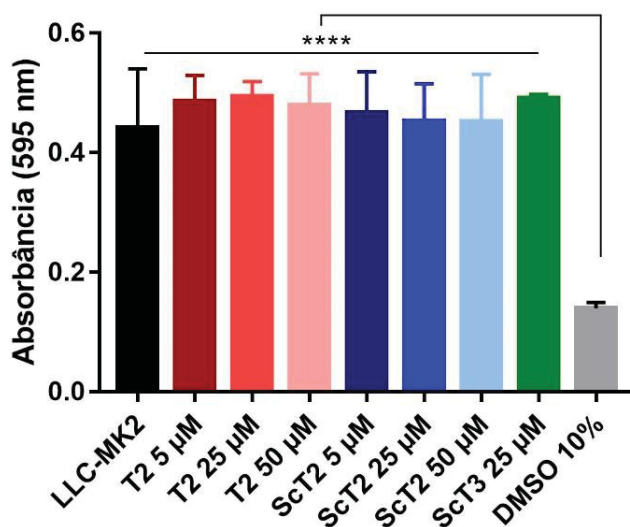
A

Ensaio de viabilidade em células LLC-MK2  
expostas ao peptídeo T2 por 24 h



B

Ensaio de viabilidade em células LLC-MK2  
expostas ao peptídeo T2 por 48 h



**Figura 18:** Ensaio de viabilidade em células da linhagem LLC-MK2.

O ensaio foi feito utilizando-se as concentrações de 5 µM, 25 µM e 50 µM do peptídeo T2, e avaliado por 24 h (A) e 48 h (B) de exposição ao tratamento. Para a detecção da viabilidade, o reagente Alamar Blue™ foi utilizado e a absorbância foi medida a 595 nm. T2 corresponde ao peptídeo sintético cuja sequência foi determinada por *Phage display*, ScT2 e ScT3 são peptídeos controles negativos de ligação, que correspondem a peptídeos na forma embaralhada (scrambled) dos peptídeos T2 e T3, respectivamente. DMSO 10% foi utilizado como uma condição de controle de redução de viabilidade celular.

De maneira semelhante ao observado para os parasitos, não houve alteração da viabilidade celular quando as células que foram tratadas com o peptídeo T2 são comparadas com as células que não receberam tratamento e também entre os grupos

tratados nas diferentes concentrações, tanto no tempo de exposição de 24 h quanto de 48 h.

Nossos resultados sugerem que o peptídeo T2 não apresenta toxicidade para os parasitos e para as células da linhagem LLC-MK2 nas concentrações e tempo de exposição avaliados.

## 7. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, muitos estudos vêm sendo realizados para elucidar os mecanismos envolvidos para o estabelecimento de doenças infecciosas, e grande parte desses estudos se concentram na identificação de moléculas alvo dos patógenos e dos hospedeiros. A contribuição da descoberta de moléculas ligantes a patógenos ocorre em diversas áreas do conhecimento, como novas terapias, candidatos vacinais, métodos de diagnósticos, além de estudos de interação patógeno-hospedeiro (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016; BAZAN, CALKOSINSKI e GAMIAN, 2012).

As técnicas bioquímicas clássicas, como coimunoprecipitação e ensaios de pull-down, são limitadas para a avaliação de um número elevado de moléculas alvo. Para contornar esse problema, a técnica de *Phage display* constitui uma abordagem muito efetiva, rápida e fácil para se fazer o *screening* de bibliotecas inteiras de peptídeos, anticorpos e/ou proteínas para se encontrar múltiplos alvos potencialmente importantes dos patógenos (ALMEIDA et al., 2011; COELHO et al., 2015; NAGANO e TSUTSUMI, 2016; RHAJEM e HOUIMEL, 2016).

Como relatado por Nixon, Sexton e Ladner (2016), diversas medicações já foram descobertas pela técnica de *Phage display*, como Adalimumabe, usada para o tratamento de artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil poliarticular, psoríase em placas, Doença de Crohn, colite ulcerativa e artrite psoriásica, assim como as medicações Belimumab e Ecallantide, empregadas no tratamento de lúpus eritematoso sistêmico e ataques agudos de angioedema hereditário, respectivamente.

Na literatura, com relação à utilização de moléculas ligantes, a aplicação de anticorpos é muito relatada para o reconhecimento de antígenos. Contudo, a produção dessas moléculas, principalmente de anticorpos monoclonais, é dispendiosa, laboriosa e necessita de processos de imunização de animais. Uma alternativa à imunização para a obtenção de anticorpos, sejam eles policlonais ou monoclonais, é realizar a busca de ligantes através de bibliotecas de scFvs, que são anticorpos

engenheirados de tamanho reduzido, e que mantém o sítio de ligação aos antígenos. Apesar de anticorpos monoclonais serem apontados como tendo maior afinidade pelo alvo, tal afinidade pode ser obtida utilizando a técnica de *Phage display* através dos ciclos de *biopanning*, que selecionam os scFvs com maior capacidade de ligação. O aumento na afinidade e especificidade dessas moléculas também pode ser obtido mais facilmente através de mutagênese aleatória ou sítio dirigida (AHMAD et al., 2012; FREI e LAI, 2016). Além disso, sabendo-se que as bibliotecas podem ter diversas origens, os scFvs podem ser humanizados para reduzir fatores relacionados com a imunogenicidade e facilitar a utilização em abordagens que envolvam os seres humanos (AYYAR e ATASSI, 2017; KHANTASUP et al., 2015).

Outra abordagem que pode ser utilizada é a busca de ligantes através de peptídeos sintéticos. A desvantagem é a necessidade de grande quantidade do peptídeo, de forma que uma biblioteca de peptídeos expressa em fagos é uma alternativa mais viável em virtude da facilidade de se produzir elevadas quantidades de bacteriófagos que expressam o peptídeo de interesse.

No nosso estudo, utilizamos a biblioteca de peptídeos construída por Bonnycastle et al. (1996) denominada X15, em que X significa qualquer aminoácido, para selecionar ligantes de superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A biblioteca utilizada apresenta tamanho de  $1,3 \times 10^9$  clones e 0% de fagos selvagens (WT), que são aqueles que não apresentam peptídeos recombinantes expressos associados a proteínas de capsídeo viral. O fago empregado na construção das bibliotecas é o f88.4, que contém duas cópias do gene que codifica para a proteína VIII (principal proteína do capsídeo viral), sendo que uma cópia codifica a proteína normal (pVIII) e a segunda cópia codifica a proteína fusionada com peptídeos na porção N-terminal (pVIIIIR), além de possuir um gene de resistência à tetraciclina.

Optamos também por utilizar formas intactas de tripomastigotas vivos, no intuito de preservar a conformação das proteínas encontradas na superfície do parasito, já que a extração poderia prejudicar a conformação proteica. Mais ainda, a utilização de parasitos intactos fornece a vantagem de os peptídeos expressos na superfície dos fagos interagirem apenas com as regiões das proteínas do protozoário que estão expostas, eliminando a possibilidade dos peptídeos se ligarem a regiões que naturalmente se encontram internalizadas pelo parasito, o que inviabilizaria a utilização das moléculas ligantes selecionadas.

Utilizando a técnica de *Phage display*, há o enriquecimento de bacteriófagos com maior capacidade de ligação ao alvo ao longo dos ciclos de seleção (ARAP, 2005; LIM, WOO e LIM, 2019). Nossos resultados confirmam o enriquecimento progressivo dos bacteriófagos ligantes (Fig. 7). Outro ponto a se destacar é que a recuperação dos bacteriófagos selvagens ligantes foi menor em relação a todos os ciclos de *biopanning* avaliados, como era esperado, já que o enriquecimento dos fagos durante o processo de seleção deve ocorrer devido aos peptídeos que são expressos fusionados a proteína pVIII do fago, mas que não estão presentes nos fagos não modificados.

Nosso dado de sequenciamento mostrou que os 12 clones de bacteriófagos sequenciados codificam 9 peptídeos distintos (não redundantes) (Tabela 4). Dos peptídeos, 3 deles apresentaram sequências similares (T4, T8 e T9). Essa alta variabilidade indica que um número maior de clones deve ser sequenciado para obtermos dados mais confiáveis sobre a frequência apresentada pelos peptídeos ligantes. Por outro lado, a alta variabilidade também pode refletir a diversidade das moléculas de superfície encontradas em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Quando as sequências obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta de bioinformática BLASTp, percebemos que a maior parte das sequências dos peptídeos compartilham similaridade com imunoglobulinas humanas (Tabela 5), o que pode indicar uma possibilidade de interação real com moléculas do hospedeiro. As prováveis interações identificadas precisam ser validadas, pois estas podem constituir mecanismos de resistência (escape) do sistema imune, ou de sensibilidade, seja via opsonização ou via clássica do sistema complemento.

Os tripanossomatídeos, principalmente quando nos referimos a *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*, apresentam mecanismos para evadir da resposta imunológica mediada por anticorpos dos hospedeiros (NARDY, FREIRE-DE-LIMA, MORROT, 2015; STIJLEMANS et al., 2016), como veremos a seguir.

O conteúdo gênico de *T. cruzi* e *T. brucei* é organizado em famílias multigênicas (PITA et al., 2019), permitindo a expressão de moléculas de superfície com epítomos não idênticos, porém semelhantes. *T. brucei* apresenta a variação antigênica clássica, em que a maior parte dos parasitos expressam uma determinada variante antigênica, enquanto uma parcela menor da população expressa uma variante antigênica diferente. Por exemplo, as glicoproteínas variantes de superfície (VSG) são as principais proteínas de revestimento e constituem a chave para o estabelecimento da

infecção a longo prazo por *T. brucei*. Quando são alvejadas por anticorpos, o complexo VSG-anticorpo é internalizado pelo parasito para destruição do anticorpo e a VSG, ou uma nova variante de VSG, que não é reconhecida pelo anticorpo anteriormente formado, é exposta, permitindo a evasão do sistema imune e a perpetuação da infecção. Além disso, a alta densidade de VSG na superfície do protozoário protege outras proteínas não variantes do reconhecimento dos anticorpos, ainda que algumas proteínas não VSGs possam estar acessíveis às imunoglobulinas (AITCHESON et al., 2006; MUGNIER, STEBBINS e PAPAVALIOU, 2016; SUNTER, WEBB e CARRINGTON, 2013).

Por outro lado, *T. cruzi* expressa simultaneamente vários determinantes antigênicos, sendo que essa variação é observada intra e inter cepas, dificultando o encontro de moléculas de superfície comuns para o desenvolvimento de terapias (TARLETON, 2015). Já foi descrito que a expansão policlonal de células B, principalmente nas fases iniciais da infecção por *T. cruzi*, produz anticorpos de baixa especificidade e afinidade pelo parasito. Também já foi relatado que a ação das transialidases, que transferem ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro vertebrado para as mucinas de superfície do parasito, gera uma carga negativa na superfície do protozoário e protege determinantes antigênicos das mucinas do parasito do reconhecimento de anticorpos anti-galactosil (CARDOSO, REIS-CUNHA e BARTHOLOMEU, 2015; PABLOS e OSUNA, 2012).

Ainda como um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, o *T. cruzi*, principalmente as formas tripomastigotas, secreta espontaneamente moléculas de membrana com potencial antigênico em um mecanismo conhecido como *shedding* (GONÇALVES et al., 1991). Das moléculas secretadas, o antígeno SAPA (Shed Acute Phase Antigen) tem sido apontado como uma molécula capaz de induzir a formação de anticorpos em pessoas infectadas e, sendo o antígeno secretado, o parasito evade do reconhecimento dos anticorpos produzidos (BRENIÈRE et al., 1997; VOLTA et al., 2015).

Também referente às análises de BLASTp, encontramos as mucinas e as fosfolipases A2. Relatos da literatura indicam que a glicoproteína gp82 é capaz de se ligar na mucina gástrica, contribuindo para o estabelecimento da infecção de formas tripomastigotas metacíclicas por via oral (NEIRA et al., 2003; YOSHIDA, 2009; YOSHIDA, 2006). Apesar do fato de que nenhuma proteína específica de formas tripomastigotas tenha sido relatada como ligante de mucinas, é possível que o parasito

apresente moléculas de superfície de interajam com tais glicoproteínas, principalmente quando consideramos o contato de hospedeiros vertebrados com sangue contaminado. Esse tipo de contaminação pode ocorrer, por exemplo, de forma acidental ou quando levamos em consideração a manutenção do ciclo do parasito no meio silvestre, em que os animais podem se contaminar através da predação de outros mamíferos parasitados (JANSEN, 2013; JANSEN, XAVIER e ROQUE, 2018; TELLERIA e TIBAYRENC, 2017). Dessa maneira, assim como ocorre com as formas tripomastigotas metacíclicas, a interação de proteínas de formas tripomastigotas com as mucinas pode consistir em uma forma de adesão do parasito ao sistema gastrointestinal, para posterior invasão de células epiteliais subjacentes.

Em contrapartida, quando consideramos as fosfolipases A2 em tripanossomatídeos, alguns estudos relacionam as enzimas com a regulação da entrada de cálcio em *Trypanosoma brucei* (EINTRACHT, 1998), assim como com a progressão de lesões cutâneas causadas por *Leishmania amazonensis* (PASSERO et al., 2008). Bordon et al. (2018) observaram que inibidores de fosfolipase A2 de *Leishmania amazonensis* reduziu o parasitismo na pele de camundongos infectados. Em *T. cruzi*, Connelly e Kierszenbaum (1984) expuseram que o pré-tratamento de formas tripomastigotas com fosfolipase A2 aumentou a infectividade em macrófagos, e a presença de inibidores da enzima impediu a associação dos parasitos com macrófagos e também com células não fagocíticas, mas a fonte da enzima não foi bem esclarecida pelos autores. É notável a carência de estudos que relacionam fosfolipases do hospedeiro mamífero com o parasito, não nos permitindo tirar conclusões mais precisas acerca da possível interação patógeno-hospedeiro.

Semelhante ao observado em relação às fosfolipases A2, os estudos que relacionam miosina quinase (também encontrada nas análises de BLASTp) ao parasito são incipientes. Especulações são feitas em virtude de ser demonstrado que o parasito provoca alterações no citoesqueleto de células infectadas, que o auxilia nos processos invasão, estabelecimento da infecção e multiplicação no citoplasma da célula infectada, além do fato de já ser demonstrado que o parasito afeta a contratilidade de cardiomiócitos (MOTT et al., 2009; TANIWAKI et al., 2006).

Apesar de todas as predições realizadas com o BLASTp a respeito de possíveis proteínas humanas que podem mimetizar a interação que os peptídeos selecionados realizam com moléculas de superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, ensaios de competição precisam ser feitos para comprovar a possível interação.

Nossas análises utilizando a ferramenta Phyre2 demonstraram que as sequências cobertas pelo alinhamento das proteínas mimetizadas pelos peptídeos selecionados estão expostas (Figura 8), indicando que tais moléculas podem constituir reais sítios de interação com o parasito. As predições 3D também demonstraram que muitas das sequências estão presentes nos sítios de ligação ao antígeno das imunoglobulinas, o que poderia indicar um mecanismo de defesa dos hospedeiros vertebrados na tentativa de eliminar o protozoário, ainda que predições de regiões de junção também apareceram nos resultados. Nesse caso, o resultado encontrado sinaliza que o parasito pode ter mecanismos de ligação aos anticorpos em regiões que impedem seu reconhecimento efetivo pelas moléculas, evadindo do sistema imunológico.

A localização da sequência referente ao peptídeo T3 em sítios de reconhecimento ao antígeno presente em receptores de células T (Figura 8C) pode indicar que as moléculas alvo nas formas tripomastigotas são potencialmente antigênicas. Conseqüentemente, tais moléculas poderiam ser processadas e expressas por células apresentadoras de antígenos, que expõem os antígenos aos linfócitos T para desenvolver uma resposta imune na tentativa de combater o protozoário.

Saénz-Garcia (2018, dados não publicados), após utilização da técnica de *Phage display* para encontrar peptídeos ligantes de formas epimastigotas de *T. cruzi*, também utilizou a ferramenta Phyre2 para demonstrar que os resíduos do peptídeo encontrado, denominado EPI18, estavam expostos nas proteínas preditas na análise de BLASTp. O trabalho demonstra a possibilidade de outros sítios reais de interação de proteínas do hospedeiro invertebrado com outra forma evolutiva do protozoário.

Utilizando a ferramenta MEME, encontramos 5 domínios conservados entre os peptídeos (Figura 9). Tendo em vista que as sequências dos peptídeos obtidos não apresentam alto grau de similaridade, os domínios observados podem constituir sítios importantes para a interação com o parasito.

Assim como Costa et al. (2019), Li et al. (2019), Li et al. (2019) e Liu et al. (2019), uma vez que os clones de bacteriófagos foram selecionados, nós utilizamos o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para comprovar a capacidade de ligação dos clones com a superfície das formas tripomastigotas (Figura 11). Nós encontramos sete clones de bacteriófagos em que é possível notar que os peptídeos expressos na superfície do fago podem reconhecer e se ligar a moléculas presentes

na superfície das formas tripomastigotas com maior seletividade, quando comparados com o bacteriófago não modificado (WT). Novamente, o resultado indica que a interação ocorre em virtude dos peptídeos não próprios do bacteriófago. O clone expressando o peptídeo T2 foi o que demonstrou maior reatividade, sendo que nós o escolhemos para prosseguir com os demais testes, porém, os outros peptídeos também serão avaliados posteriormente.

Ainda que o ensaio de imunoadsorção enzimática seja uma forma simples de fazer uma avaliação dos clones de bacteriófagos de maior reatividade, nós ainda realizaremos testes de ligação com os peptídeos sintéticos (tanto T2 quanto os demais peptídeos selecionados) utilizando outras metodologias, como por exemplo, usando os peptídeos com marcação. Tal necessidade ocorre em virtude de que a reatividade observada quando o ELISA é realizado com os bacteriófagos pode ser influenciada pelas proteínas próprias do bacteriófago, que podem estabilizar ou prejudicar a ligação dos peptídeos com a superfície das formas tripomastigotas. Além disso, o resultado obtido pode ser influenciado pela quantidade de proteínas recombinantes que o fago expressa, que pode variar para cada peptídeo.

Além de se ligar na superfície do parasito, nós também avaliamos se o peptídeo T2 poderia influenciar os processos de infecção, já que muitos peptídeos são descritos com atividade de redução e/ou bloqueio da infecção de células por patógenos. Por exemplo, Krepstakies et al. (2012) demonstraram que peptídeos sintéticos anti-lipopolissacarídeos (SALPS) podem inibir a infecção dos vírus HIV-1, HSV (1 e 2), HBV e HCV, através da ligação em porções de heparan sulfato nas respectivas células hospedeiras, podendo-se desenvolver terapias visando o bloqueio de infecções virais múltiplas. Também, Jakobsen et al (1998) relataram um peptídeo que bloqueou a infecção de merozoítos de *Plasmodium falciparum* em eritrócitos e Ye et al. (2016) encontraram um peptídeo através da técnica de *Phage display* que impediu a adesão do vírus HBV em células hepáticas, ação que culminou no impedimento da infecção viral por meio do bloqueio da região preS1 de glicoproteínas de envelope do vírus.

Recentemente, nosso grupo desenvolveu um scFv, denominado 10D8, que reduziu as taxas de infecção de formas tripomastigotas metacíclicas em monocamadas de células LLC-MK2, por alvejar gp35/50 do parasito. Dessa forma, pode-se pensar na utilização do scFv 10D8 em estratégia de paratransgênese, no intuito de alvejar o parasito no hospedeiro invertebrado e impedir os ciclos de perpetuação de contaminação dos hospedeiros mamíferos (DEMEU et al., 2019).

Neste trabalho, demonstramos que, dos clones de bacteriófagos selecionados através da técnica de *Phage display*, o clone que expressa o peptídeo denominado T2 se mostrou mais promissor para bloquear a infecção de formas tripomastigotas em monocamadas de células LLC-MK2 (Figura 12). Sendo assim, o peptídeo T2 sintético foi escolhido para a realização dos demais ensaios de bloqueio de infecção. Nossos resultados inicialmente demonstraram que a taxa de infecção dos parasitos que estiveram em contato com os fagos que expressam o peptídeo T2 foi maior quando o tempo de infecção foi de 24 h, em comparação com a infecção realizada por apenas 2 h (Figura 13), mas utilizando-se as mesmas concentrações de fagos em ambos ensaios. Tal resultado pode indicar que o parasito possui mecanismos de eliminação de moléculas ligantes quando em contato com essas moléculas por um tempo prolongado, ou a ligação do fago à superfície do parasito é capaz de atrasar a infecção, porém não bloqueia permanentemente o processo infeccioso.

Observamos ainda que o peptídeo sintético foi capaz de reduzir as taxas de infecção em todas as concentrações utilizadas (5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) (Figura 14A). Apesar de nossos peptídeos controle (Scrambled) causarem uma leve redução na infectividade independente da concentração, podemos inferir que a escolha da sequência dos scrambled eliminou domínio(s) importante(s) para a interação com o parasito. Contudo, a capacidade de ligação deverá ser validada também pela incubação com peptídeos marcados.

Além do número de células infectadas ter sido reduzido quando os parasitos foram tratados com o peptídeo sintético, o número de amastigotas intracelulares também foi reduzido nas concentrações de 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de T2 (Figura 14B), refletindo a menor capacidade de invasão das formas tripomastigotas.

Posteriormente fomos avaliar se a redução da capacidade de infecção dos parasitos poderia estar associada a uma redução da viabilidade do protozoário em virtude de uma possível atividade tóxica exercida pelo peptídeo T2.

Nesse contexto, diversos autores já relataram a ação de peptídeos potencialmente tóxicos e com atividade lítica, que se dá inicialmente pela interação eletrostática com a membrana plasmática, com posterior formação de um poro na membrana, provocando a morte do alvo por necrose (CHEN et al., 2012). Por exemplo, Liu et al. (2016) desenvolveram um peptídeo lítico e demonstraram a redução de viabilidade de células U937 através de ensaios mediados por MTT, além de ZHONG e CHAU (2008), que expuseram a possibilidade de utilização de peptídeos

líticos como agentes com atividade anticâncer para contornar problemas relacionados a resistência a drogas.

Em *T. cruzi*, já em 1995, Barr, Rose e Jaynes relataram a atividade lítica do peptídeo denominado DC-1 em formas amastigotas intracelulares. A molécula promoveu a redução da parasitemia em camundongos infectados que foram tratados com o peptídeo. Por outro lado, Durvasula et al (1997) apresentaram a potencial aplicação em paratransgênese do peptídeo antimicrobiano Cecropin A, ao observarem que o peptídeo expresso no intestino do vetor *Rhodnius prolixus* pela bactéria *Rhodococcus rhodnii* modificada era capaz de reduzir a quantidade de formas tripomastigotas metacíclicas presentes no inseto. Adade et al. (2016) também relataram a atividade tóxica do peptídeo antimicrobiano (AMP) melitina em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas intracelulares.

Contrariamente ao que é relatado na literatura para outros peptídeos, o peptídeo T2 não apresentou atividade tóxica para os parasitos em 3 h de exposição. Quando o tempo de exposição foi elevado para 24 h, observamos uma redução na viabilidade dos parasitos (Figura 17). Contudo, não podemos associar o peptídeo T2 ao decréscimo da viabilidade, tendo em vista que as formas tripomastigotas que não foram expostas a nenhum tipo de tratamento também apresentaram viabilidade reduzida quando comparados com os parasitos não tratados que foram avaliados por 3 h. Levando em consideração que as formas tripomastigotas são mantidas através de infecção em monocamadas celulares, nosso resultado pode indicar que a taxa de sobrevivência dos tripomastigotas é baixa quando o parasito se encontra em um ambiente fora de cultivo celular. Dessa maneira, podemos concluir que o peptídeo T2 é capaz de interagir com a superfície das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, mas não apresenta atividade tóxica e, conseqüentemente, atividade lítica para o parasito.

De forma semelhante, a viabilidade das células LLC-MK2 não foi reduzida quando as células foram tratadas com o peptídeo T2 por 24 h e 48 h nas mesmas concentrações testadas (5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) para os parasitos (Figura 18).

Em virtude da não toxicidade do peptídeo T2 para o parasito, a utilização da molécula para alvejar os protozoários poderia ser associada a moléculas tóxicas, como o Benznidazol, já utilizado no tratamento de pessoas infectadas, e Cecropin A, como foi mencionado anteriormente nesse tópico.

Ainda com relação às moléculas tóxicas, Madison et al. (2007) demonstraram que as defensinas  $\alpha$ -1 induzem a apoptose de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após

mediarem a formação de um poro na membrana do parasito e induzirem a fragmentação do DNA nuclear e mitocondrial. Johnson et al. (2013) expuseram que as mesmas defensinas são capazes de promover o descolamento e liberação do flagelo do parasito e reduzem as taxas de infecção em aproximadamente 80%. Os trabalhos sugerem que derivados de defensinas podem ser explorados como agentes com atividade tripanocida a serem direcionados especificamente ao protozoário mediante moléculas ligantes de superfície.

Já relatamos que MacGregor et al. (2019) utilizaram um anticorpo fusionado a pirolobenzodiazepina (PBD) para eliminar a infecção em camundongos por *T. brucei*. Similarmente, poderíamos avaliar a atividade da toxina associada ao peptídeo T2 em *T. cruzi*, tendo em vista que os tripanossomatídeos podem ser suscetíveis a drogas que se liguem ao sulco menor do DNA (BARRET, GEMMEL e SUCKLING, 2013), como ocorre com o mecanismo de ação de PBD. Com ação similar, dois derivados de N-fenilbenzamida bis (2-aminoimidazol) e de cinco compostos estruturalmente similares a distamicinas foram relatados por Millan et al. (2017) e Scott et al. (2016), respectivamente, contra *T. brucei*. Além de também já ser mostrado a atividade de compostos ligantes a DNA em outras infecções parasitárias, como nas leishmanioses e malária (SANDS, KRON e BROWN, 1985; YERAMIAN et al., 2005).

Sabemos que muitas doenças precisam urgentemente de novas terapias, mas também é sabido acerca da dificuldade do desenvolvimento de novas medicações. Dessa forma, paralelamente aos estudos de descobrimento de moléculas terapêuticas mais eficazes, é possível se pensar em novas abordagens terapêuticas para melhorar a atuação das drogas atualmente existentes (que em sua maioria são apontadas como possuindo elevada toxicidade ao paciente) para essas diversas enfermidades.

Uma nova abordagem terapêutica que tem despertado o interesse nas mais diversas áreas da medicina é a utilização de nanopartículas. No campo biológico, os relatos variam desde tratamentos a métodos de diagnóstico (KHAN, SAEED e KHAN, 2019). No caso da utilização de nanopartículas como um sistema de entrega de drogas aplicado a tratamentos, as vantagens relatadas são das mais diversas: incluem a possibilidade de direcionamento específico para o local de ação mediante associação com moléculas de ligação ao alvo, assim como a liberação gradual de drogas, que reduz os efeitos colaterais associados às medicações e contribui para maior adesão dos pacientes aos processos terapêuticos (ALEXIS et al., 2008; JONG e BORM, 2008; VARSHOSAZ e FARZAN et al., 2015).

Embora muito exploradas na área de diversos tipos de câncer, as nanopartículas também vêm sendo estudadas em abordagens que envolvem os tripanossomatídeos, como descrito anteriormente (item 2.2).

Nesse sentido, Arias et al. (2014) adotaram uma abordagem para eliminar cepas de *Trypanosoma brucei* resistentes à medicação usual, pentamidina. Os autores descobriram um nanobody que, em virtude do tamanho reduzido, foi capaz de reconhecer regiões conservadas mais internas das VSGs do parasito e, associado ao nanobody, o grupo fusionou nanopartículas contendo pentamidina. Como resultado, uma vez que o nanobody interagiu com as VSGs, o parasito internalizava o sistema de entrega de drogas, recebendo a medicação por uma via não dependente de receptor. Ainda mais, os autores também demonstraram que o parasito era eliminado utilizando-se doses de pentamidina menores àquelas empregadas no tratamento convencional, uma vez que o sistema de entrega de drogas elaborado era específico ao protozoário.

De forma similar, podemos utilizar o peptídeo T2 para direcionar especificamente nanopartículas contendo Benznidazol para o *T. cruzi*. Levando em consideração que o peptídeo T2 apresenta um tamanho menor (~2 kDa) que o nanobody (15 kDa) encontrado por Arias et al. (2014), há a possibilidade de o peptídeo também reconhecer proteínas de superfície em regiões localizadas mais próximas (internas) à membrana do protozoário, podendo levar ao reconhecimento de regiões mais conservadas do protozoário em diferentes cepas de *T. cruzi* e ampliando a sua aplicação.

Em resumo, há uma diversidade de abordagens e moléculas para alvejarem os tripanossomatídeos (e outros patógenos). Tais recursos devem ser explorados em estudos que possam contribuir para reduzir/impedir os processos infecciosos, assim como no desenvolvimento de abordagens terapêuticas para curar e/ou melhorar as condições de saúde da população infectada.

## 8. CONCLUSÕES

Neste trabalho, nosso grupo demonstrou a utilização da técnica de *Phage display* para selecionar peptídeos ligantes a superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Análises de bioinformática nos direcionam principalmente para as imunoglobulinas humanas como bons interatores, sendo que ensaios de competição

precisam ser realizados para avaliarmos se as moléculas podem realmente mimetizar a interação que os peptídeos selecionados realizam com o parasito.

Os ensaios de bloqueio de infecção demonstraram que tanto o bacteriófago expressando o peptídeo T2, assim como o peptídeo sintético, foram capazes de reduzir as taxas de infecção das formas tripomastigotas em monocamadas de células LLC-MK2. Porém, ainda que o peptídeo sintético tenha demonstrado atividade de redução da infecção, o peptídeo não possui atividade tóxica para os parasitos e para células mamíferas em todas as concentrações utilizadas, indicando que a utilização do peptídeo T2 em abordagens para alvejar e eliminar o parasito deve ser associada a moléculas tóxicas para o protozoário.

## 9. PERSPECTIVAS

Nossos próximos passos consistirão na continuação da caracterização da capacidade de ligação do peptídeo sintético T2 por microscopia confocal e citometria de fluxo, através da biotilação do peptídeo. Mesmo que somente o peptídeo sintético T2 tenha sido relatado no presente trabalho, nós pretendemos avaliar a capacidade de ligação e de bloqueio de infecção com os demais peptídeos selecionados, também sintéticos. Outra proposta é analisar a toxicidade do(s) peptídeo(s) por métodos mais precisos, como ensaios mediados por iodeto de propídio, seguido da análise em citometria de fluxo.

Além disso, tendo em vista a diversidade genética e fenotípica do *T. cruzi*, nós objetivamos realizar nossos ensaios posteriores com peptídeos ligantes em diferentes cepas do protozoário, com a finalidade de encontrar ligantes que possuam alvos comuns entre os parasitos.

Recentemente, o pós-doutorando Guilherme Picheth, do departamento de Patologia Básica, conjugou o peptídeo T2 em nanopartículas. Essa conjugação permitirá que nossos ensaios sejam feitos com drogas encapsuladas (como o Benznidazol), no intuito de desenvolver um sistema de entrega de drogas específico para o parasito. Ainda nesse contexto, pretendemos realizar experimentos de peptídeos conjugados a drogas em modelos *in vivo* infectados com o protozoário.

O sucesso dessa linha de pesquisa contribuirá no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para alvejar o parasito nos hospedeiros vertebrados,

reduzindo doses necessárias das medicações, assim como os efeitos colaterais causados pelas terapias atuais.

“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

## 10. 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*, 69:227-239, 2013.
- AGHEBATI-MALEKI, L., BAKHSHINEJAD, B., BARADARAN, B., MOTALLEBNEZHAD, M., AGHEBATI-MALEKI, A., NICKHO, H., YOUSEFI, M. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci.*, 23:66, 2016.
- AHMAD, Z.A., YEAP, S.K., ALI, A.M., HO, W.Y., ALITHEEN, N.B.M., HAMID, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, doi: 10.1155/2012/980250.
- AITCHESON, N., TALBOT, S., SHAPIRO, J., HUGHES, K., ADKIN, C., BUTT, T., SHEADER, K., RUDENKO, G. VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection. *Mol Microbiol.*, 57(6): 1608–1622, 2006.
- ALBERTINI, L.A., MACEDO, A.M., CHIARI, E., ANDREWS, N.W., ANDRADE, L.O. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect.* 12:784–789, 2010.
- ALESSIO, G.D., DE ARAÚJO, F.F., CÔRTEZ, D.F., JÚNIOR, P.A.S., LIMA, D.C., GOMES, M de S., AMARAL, L.R., XAVIER, M.A.P., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., DE LANA, M. Performance of TcI/TcVI/TcII Chagas-Flow ATE-IgG2a for universal and genotype-specific serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), 2017.
- ALESSIO, G.D., DE ARAÚJO, F.F., D.F., JÚNIOR, P.A.S., GOMES, M de S., DO AMARAL, L.R., XAVIER, M.A.P., TEIXEIRA-CARVALHO, A., DE LANA, M., MARTINS-FILHO, O.A. Accomplishing the genotype-specific serodiagnosis of single and dual *Trypanosoma cruzi* infections by flow cytometry Chagas-Flow ATE-IgG2a. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), 2018.
- ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L.K., FAROKHZAD, O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.*, 5:505-515, 2008.
- ALMEIDA, S.S., MAGALHÃES, A.A. SOARES, C.S., ZURITA-TURK, M., GOULART, L.R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. The phage display technique: advantages and recent patents. *Recent Pat DNA Gene Seq.*, 5(2):136-48, 2011.
- ALVAREZ, M.N., PELUFFO, G., PIACENTA, L., RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J. Biol. Chem.* 286:6627–6640, 2011.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.A., FRANYUTI-KELLY, G.A., DÍAZ-LÓPEZ-SILVA, R., GONZÁLEZ-CHÁVEZ, A.M., GONZÁLEZ-HERMOSILLO-CORNEJO, D., VÁSQUEZ-

LÓPEZ, R. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de México*, 81(3), 154-164, 2018.

AMORIM, J.C., BATISTA, M., CUNHA, E.S.Da, LUCENA, A.C.R., LIMA, C.V.P., SOUSA, K., KRIEGER, M.A., MARCHINI, F.K. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Scientific Reports*, 7, 2017.

ARAP, M.A. Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), 2005.

ARAÚJO, P.F., ALMEIDA, A.B., PIMENTEL, C.F., SILVA, A.R., SOUSA, A., VALENTE, S.A., VALENTE, V.C., BRITTO, M.M., ROSA, A.C., ALVES, R.M., HAGSTROM, L., TEIXEIRA, A.R.L. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(6): 437–446, 2017.

ASHFAQ, U.A., RIAZ, M., YASMEEN, E., YOUSAF, M.Z. Recent Advances in Nanoparticle-Based Targeted Drug-Delivery Systems Against Cancer and Role of Tumor Microenvironment. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, 34(4):317-353, 2017.

ASTHANA, S., GUPTA, P.K., JAISWAL, A.K., DUBE, A., CHOURASIA, M.K. Overexpressed Macrophage Mannose Receptor Targeted Nanocapsules- Mediated Cargo Delivery Approach for Eradication of Resident Parasite: In Vitro and In Vivo Studies. *Pharm Res.*, 32(8):2663-77, 2015.

AYUB, M., NYAMBEGA, B., SIMONETTI, L., DUFF, T., LONGHI, S.A., GÓMEZ, K.A., HOEBEKE, J., LEVIN, M.J., SMULSKI, C.R. Selective blockade of trypanosomatid protein synthesis by a recombinant antibody anti-*Trypanosoma cruzi* P2 $\beta$  protein. *PLoS One*, 7(5), 2012.

BAETKE, S.C., LAMMERS, T., KIESSLING, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br J Radiol.*, 88(1054):20150207, 2015.

BAYER-SANTOS, E., CUNHA-e-SILVA, N. L., YOSHIDA, N., FRANCO DA SILVEIRA, J. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasites & Vectors*, 6, 127, 2013.

BAKER, N., HAMILTON, G., WILKES, J.M., HUTCHINSON, S., BARRETT, M.P., HORN, D. Vacuolar ATPase depletion affects mitochondrial ATPase function, kinetoplast dependency, and drug sensitivity in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(29), 9112–9117, 2015.

BALOUZ, V., AGUERO, F., BUSCAGLIA, C.A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Advances in Parasitology*, 97: 1-45, 2017.

BARRET, M.P., GEMMELL, C.G., SUCKLING, C.J. Minor groove binders as anti-infective agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 139:12-23.

- BARR, S.C., ROSE, D., JAYNES, J.M. Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro and parasitemias in mice. *J Parasitol.*, 81(6):974-8, 1995.
- BARRIAS, E., REIGNAULT, L., CARVALHO, T.M.U. de, SOUZA, W. Clathrin coated pit dependent pathway for *Trypanosoma cruzi* internalization into host cells. *Acta Tropica*, 199, 2019.
- BAZAN, J., CALKOSINSKI, I., GAMIAN, A. Phage display - A powerful technique for immunotherapy. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother.*, 8(12):1817–1828, 2012.
- BERMUDEZ, J., DAVIES, C., SIMONAZZI, A., REAL, J.P., PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, 156: 1-16, 2016.
- BONNIER, F., KEATING, M. E., WRÓBEL, T. P., MAJZNER, K., BARANSKA, M., GARCIA-MUNOZ, A., BLANCO, A., BYRNE, H. J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In Vitro*, 29(1):124-31, 2015.
- BONNYCASTLE, L. L. C.; MEHROKE, J. S.; RASHED, M.; GONG, X.; SCOTT, K. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol.*, 258(5):747–62, 1996.
- BORDON, M.L.A.C., LAURENTI, M.D., RIBEIRO, S.P., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O, PASSERO, L.F.D. Effect of phospholipase A2 inhibitors during infection caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, 24, 2018.
- BRENIÈRE, S.F., YAKSIC, N., TELLERIA, J., BOSSENSO, M-F., NOIREAU, F., WINCKER, P., SANCHEZ, D. Immune Response to *Trypanosoma cruzi* Shed Acute Phase Antigen in Children from an Endemic Area for Chagas' Disease in Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92(4): 503-507, 1997.
- BRENIÈRE, S.F., WALECKX, E., BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), 2016.
- BROCKMANN, E.C. Selection of stable scFv antibodies by phage display. *Methods Mol Biol.*, 907:123-44, 2012.
- BUSCAGLIA, C.A., CAMPO, V.A., FRASCH, A.C., DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4:229–236, 2006.
- CAI, C.W., BLASE, J.R., ZHANG, X., EICKHOFF, C.S., HOFT, D.F. Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.*, 12(10), 2016.
- CALDERANO, S., GODOY, P., SOARES, D., SANT'ANNA, O.A., SCHENKMAN, S., ELIAS, M.C. ORC1/CDC6 and MCM7 distinct associate with chromatin through *Trypanosoma cruzi* life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 196(2):110-113, 2014.

CAMPO, V.L., MARCHIORI, M.F., CARVALHO, I. Insights into Anti-Trypanosomal Agents Based on Synthetic Glycoconjugates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(5), 2018.

CARDOSO, M.V.O., FILHO, G.B.O., SIQUEIRA, L.R.P., ESPÍNOLA, J.W.P., DaSILVA, E.B., MENDES, A.P.O., PEREIRA, V.R.A., DeCASTRO, M.C.A.B., FERREIRA, R.S., VILLELA, F.S., DaCOSTA, F.M.R., SOARES, M.B.P., LEITE, A.C.L. 2-(phenylthio)ethylidene derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: Structural design, synthesis and antiparasitic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 191-203, 2019.

CARREA, A., DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 11(1), 2016.

CERETTI-JUNIOR, W., VENDRAMI, D.P., DE MATOS-JUNIOR, M.O., RIMOLDI-RIBEIRO, A., ALVAREZ, J.V., MARQUES, S., DUARTE, A.N., DA SILVA, R.A., DA ROSA, J.A., MARRELLI, M.T. Occurrences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) and first reports of *Panstrongylus geniculatus* in urban environments in the city of Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop.*, 60, 2018.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1(2):159-218, 1909.

CHEN, L., TU, Z., VOLOSHCHUK, N., LIANG, J.F. Lytic Peptides with Improved Stability and Selectivity Designed for Cancer Treatment. *J Pharm Sci*, 101:(4), 1508–1517, 2012.

CLEMENTE, T.M., CORTEZ, C., NOVAES, A.S., YOSHIDA, N. Surface Molecules Released by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Downregulate Host Cell Invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 10(8), 2016.

CONNELLY, M. C., KIERSZENBAUM, F. Modulation of macrophage interaction with by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 121 (3): 931-939, 1984.

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*, 16(3):315-327, 1985.

COSTA, L.E., ALVES, P.T., CARNEIRO, A.P., DIAS, A.C.S., FUJIMURA, P.T., ARAUJO, G.R., TAVARES, G.S.V., RAMOS, F.F., DUARTE, M.C., MENEZES-SOUZA, D., BRIZA, P., BRIZA, F.F., COELHO, E.A.F., GOULART, L.R. *Leishmania infantum*  $\beta$ -Tubulin Identified by Reverse Engineering Technology through Phage Display Applied as Theranostic Marker for Human Visceral Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*. 20(8): 1812, 2019.

COSTA, L.E., SALLES, B.C., ALVES, P.T., DIAS, A.C., VAZ, E.R., RAMOS, F.F., MENEZES-SOUZA, D., DUARTE, M.C., ROATT, B.M., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., TAVARES, C.A., GONÇALVES, D.U., ROCHA, M.O., GOULART, L.R., COELHO, E.A. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods*, 434: 39-45, 2016.

COSTA, L.E., SALLES, B.C., SANTOS, T.T.O., RAMOS, F.F., LIMA, M.P., LIME, M.I.S., PORTELA, S.B.A., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., DUARTE, M.C., MENEZES-SOUZA, D., DE ÁVILA, R.A.M., SILVEIRA, J.A.G., SOARES, D.F.M., GOULART, L.R., COELHO, E.A.F. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Microbial Pathogenesis*, 110: 14-22, 2017.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3): 277-282, 2015.

CRIVIANU-GAITA, THOMPSON, M., Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 32-45, 2016.

CUCUNUBÁ, Z.M., NOUVELLET, P., CONTEH, L., VERA, M.J., ANGULO, V. M., DIB, J.C., PARRA-HENAO, G.J., BASÁÑEZ. Modelling historical changes in the force-of-infection of Chagas disease to inform control and elimination programmes: application in Colombia. *BMJ Glob Health*, 2(3), 2017.

CUCUNUBÁ, Z.M., OKUWOGA, O., BASÁÑEZ, M.G., NOUVELLET, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*, 9:42, 2016.

DAMASCENO, F.S., BARISÓN, M.J., CRISPIM, M., SOUZA, R.O.O., MARCHESE, L., SILBER, A.M. L-Glutamine uptake is developmentally regulated and is involved in metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 224:17-25, 2018.

DANTAS, E.D., SOUZA, F.J.J., NOGUEIRA, W.N.L., SILVA, C.C. AZEVEDO, P.H.A., ARAGÃO, C.F.S., ALMEIDA, P.D.O., CARDOSO, M.F.C., SILVA, F.C., AZEVEDO, E.P., BARBOSA, E.G., LIMA, E.S., FERREIRA, V.F., LIMA, A.A.N. Characterization and Trypanocidal Activity of a Novel Pyranaphthoquinone. *Molecules*, 22(10): 1631, 2017.

DARIO, M.A., RODRIGUES, M.S., BARROS, J.H. DA S., XAVIER, S.C. DAS C., D'ANDREA, P., ROQUE, A.L.R., JANSEN, A.M. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites & Vectors*, 9(1), 477, 2016.

DEMEU, L.M.K., SOARES, R.J., MIRANDA, J.S., PACHECO-LUGO, L.A., OLIVEIRA, K.G., PLAZA, C.A.C., BILLIALD, P., DeMOURA, J.F., YOSHIDA, N., ALVARENGA, L.M., DaROCHA, W.D. Engineering a single-chain antibody against *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to block cell invasion. *PLoS ONE*, 14(10): e0223773 2019.

DeSOUZA, W., DeCARVALHO, T.M., BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.*, 2010.

DEWAR, C.E., MACGREGOR, P., COOPER, S., GOULD, M.K., MATTHEWS, K.R., SAVILL, N.J., SCHNAUFER, A. Mitochondrial DNA is critical for longevity and metabolism of transmission stage *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 14(7), 2018.

DORTA, M.L., FERREIRA, A.T., OSHIRO, M.E.M., YOSHIDA, N. Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73:285–289, 1995.

DosREIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res.*, 44(2):84-90, 2011.

DosSANTOS C.M.B., LUDWIG, A., KESSLER R.L., RAMPAZZO, R.C.P., INOUE, A.H., KRIEGER, M.A., PAVONI, D.P., PROBST, C.M. *Trypanosoma cruzi* transcriptome during axenic epimastigote growth curve. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(5), 2018.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES, INITIATIVE, Initiative, 2013. Drug Trial for Leading Parasitic Killer of the Americas Shows Mixed Results but Provides New Evidence for Improved Therapy. Disponível em: <http://www.dndi.org/media-centre/press-releases/1700-e1224.html?highlight=WyJIMTIyNCJd>. Acesso em 15 de novembro de 2019.

DU, D., FU, H.J., REN, W.W., LI, X.L., GUO, L.H. PSA targeted dual-modality manganese oxide-mesoporous silica nanoparticles for prostate cancer imaging. *Biomed Pharmacother.*, 121:109614, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109614.

DURANTI, C., CARRARESI, L., SETTE, A., STEFANINI, M., LOTTINI, T., CRESCIOLI, S., CROCIANI, O., IAMELE, L., DeJONGE, GHERARDI, E., ARCANGELI, A. Generation and characterization of novel recombinant anti-hERG1 scFv antibodies for cancer molecular imaging. *Oncotarget.*, 9:34972-34989, 2018.

DURAN-REHBEIN, G.A., VARGAS-ZAMBRANO, J.C., CUÉLLAR, A., PUERTA, C.J., GONZALEZ, J.M. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. *Parasite*, 21:38, 2014.

DURVASULA, R.V., GUMBS, A., PANACKAL, A., KRUGLOV, O., AKSOY, S., MERRIFIELD, B., RICHARDS, F.F., BEARD, C.B. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *PNAS*, 94:(7), 3274-3278, 1997.

EBRAHIMIZADEH, W., RAJABIBAZL, M. Bacteriophage Vehicles for Phage Display: Biology, Mechanism, and Application. *Curr Microbiol.*, 69(2):109-20, 2014.

EICKHOFF, C. S., ZHANG, X., VASCONCELOS, J. R., MOTZ, R. G., SULLIVAN, N. L., O'SHEA, K., POZZI, N., GOHANA, D.W., BLASE, J.R., DI CERA, E., HOFT, D. F. Costimulatory Effects of an Immunodominant Parasite Antigen Paradoxically Prevent Induction of Optimal CD8 T Cell Protective Immunity. *PLoS Pathogens*, 12(9), 2016.

EINTRACHT, J., MAATHAI, R., MELLORS, A., RUBEN, L. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *Biochem J.*, 336:659-66, 1998.

FAVILA-RUIZ, G., JIMÉNEZ-CORTÉS, J.G., CÓRDOBA-AGUILAR, A., SALAZAR-CHETTINO, P.M., GUTIÉRREZ-CABRERA, A.E., PÉREZ-TORRES, A., DE FUENTES-VICENTE, J.A., VENCES-BLANCO, M.O., BUCIO-TORRES, M.I., FLORES-VILLEGAS, A.L., CABRERA-BRAVO, M. Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasit Vectors*, 11(434), 2018.

FERMIN, G., RAMPERSAD, S., TENNAT, P. Chapter 12 - Viruses as Tools of Biotechnology: Therapeutic Agents, Carriers of Therapeutic Agents and Genes, Nanomaterials, and More. *Viruses*, 291-316, 2018.

FORSYTH, C.J., HERNANDEZ, S., OLMEDO, W., ABUHAMIDAH, A., TRAINA, M.I., SANCHEZ, D.R., SOVEROW, J., MEYMANDI, S.K. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 63(8): 1056–1062, 2016.

FREI, J.C., LAI, J.R. Chapter Three - Protein and Antibody Engineering by Phage Display. *Methods in Enzymology*, 580:45-87, 2016.

FREI, J.C., LAI, J.R. Protein and Antibody Engineering by Phage Display. *Methods Enzymol.*, 580:45–87, 2016.

FUENTES-VICENTE, J.A. DE, VIDAL-LÓPEZ, D.G., FLORES-VILLEGAS, L., MORENO-RODRÍGUEZ, A., ALBA-ALVARADO, M.C. DE, SALAZAR-SCHETTINO, M., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.H., GUTIÉRREZ-CABRERA, A.E. *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Tropica*, 195: 51-57, 2019.

GALETOVIC, A., SOUZA, R. T. SANTOS, M. R. M., CORDERO, E. M., BASTOS, I. M. D., SANTANA, J. M., RUIZ, J. C., LIMA, F. M., MARINI, M. M., MORTARA, R. A., SILVEIRA, J. F. The Repetitive Cytoskeletal Protein H49 of *Trypanosoma cruzi* Is a Calpain-Like Protein Located at the Flagellum Attachment Zone. *PLoS ONE*, 6(11):e27634, 2011.

GAN, B.K., YONG, C.Y., HO, K.L., OMAR, A.R., ALITHEEN, N.B., TAN, W.S. Targeted Delivery of Cell Penetrating Peptide Virus-like Nanoparticles to Skin Cancer Cells. *Scientific Reports*, 8:8499, 2018.

GOES, G.R., ROCHA, P.S., DINIZ, A.R.S., AGUIAR, P.H.N., MACHADO, C.R., VIEIRA, L.Q. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(4), 2016.

GOMES, A., KORF, B. *Genetic Testing Techniques*. In: ROBIN, N.H. and FARMER, M.B. *Pediatric Cancer Genetic*, Pages 47-64, 2018.

GOMES, C., ALMEIDA, A. B., ROSA, A.C., ARAUJO, P.F., TEIXEIRA, A.R.L. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *International Journal of Infectious Diseases*, 81:81-84, 2019.

GONÇALVES, C.S., ÁVILA, A.R., SOUZA, W., MOTTA, M.C.M., CAVALCANTI, D.P. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & Vectors*, 11: 83, 2018.

GONÇALVEZ, M.F., UMEZAWA, E.S., KATZIN, A.M., DeSOUZA, W., ALVEZ, M.J.M., ZINGALES, B., COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Experimental Parasitology*, 72(1), 43-53, 1991.

GONZALEZ-ORTIZ, L.M., SANCHEZ-VILLAMIL, J.P., CEIS-RODRIGUEZ, M.A., LINEROS, G., SANABRIA-BARRERA, S., SERRANO, N.C., RINCON, M.Y., BAUTISTA-NINO, P.K. Measuring mitochondrial respiration in adherent cells infected with *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 using Seahorse extracellular flux analyser. *Folia Parasitol (Praha)*, 2019.

Measuring mitochondrial respiration in adherent cells infected with *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 using Seahorse extracellular flux analyser. *Folia Parasitol (Praha)*, 2019.

GUTIÉRREZ, Y.I., SCULL, R., VILLA, A., SATYAL, P., COS, P., MONZOTE, L., SETZER, W.N. Chemical Composition, Antimicrobial and Antiparasitic Screening of the Essential Oil from *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. *Molecules*, 24;24(8), 2019.

HERREROS-CABELLO, A., CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F., FRESNO, M. GIRONÈS, N. Comparative proteomic analysis of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* strains with different pathogenicity. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019.

HIRANO, D., OHSHIMA, N., KUBOTA-KOKETSU, R., YAMASAKI, A., KUROSAWA, G., OKUNO, Y., YOSHIDA, S., KUROSAWA, Y. Three Types of Broadly Reacting Antibodies against Influenza B Viruses Induced by Vaccination with Seasonal Influenza Viruses. *J Immunol Res.*, 2018.

HOEN, P.A.C., JIRKA, S.M.G., BROEKEA, B.R.T., SCHULTES, E.A., AGUILERA, B., PANG, K.H., HEEMSKERKA, H., AARTSMA-RUSA, A., OMMEM, G.J.V., DUNNEN, J.T. Phage display screening without repetitious selection rounds. *Analytical Biochemistry*, 421(2): 622-631, 2012.

HOTEZ, P.J., PECOUL, B., RIJAL, S., BOEHME, C., AKSOY, S., MALECELA, M., TAPIA-CONYER, R., REEDER, J.C. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10:(3), 2016.

INGRAM, J.R., SCHMIDT, F.I., PLOEGH, H.L. Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annual Review of Immunology*, 36:695-715, 2018.

IZUMI E., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, B.P.D., JUNIOR, V.F.V., NAKAMURA, C.V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Rep.*, 28(4):809-23, 2011.

JAKOBSEN, P.H., HEEGAARD, P.M.H., KOCH, C., WASNIOWSKA, K., LEMNGE, M.M., JENSEN, J.B., SIM, B.K.L. Identification of an Erythrocyte Binding Peptide from

the Erythrocyte Binding Antigen, EBA-175, Which Blocks Parasite Multiplication and Induces Peptide-Blocking Antibodies, *Infect Immun.*, 66(9):4203-7, 1998.

JANSEN, A.M., XAVIER, S.C.C., ROQUE, A.L.R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11, 2018.

JOHNSON, C.A., RACHAKONDA, G., KLESHCHENKO, Y.Y., PIUS, N.N., MADISON, M.N., PRATAP, S., CARDENAS, T.C., TAYLOR, C., LIMA, M.F., VILLALTA, F. Cellular Response to *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Secretion of Defensin  $\alpha$ -1, Which Damages the Flagellum, Neutralizes Trypanosome Motility, and Inhibits Infection. *Infect Immun.*, 81(11):4139–4148, 2013.

JUNIOR, P.A.S., MOLINA, I., MURTA, S.M.F., SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A., SALVADOR, F., CORRÊA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, C.M. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg.*, 8, 97(5): 1289–1303, 2017.

KELLY, M.P., LEE, F.T., TAHTIS, K., POWER, B.E., SMYTH, F.E., BRECHBIEL, M.W., HUDSON, P.J., SCOTT, A.M. Tumor Targeting by a Multivalent Single-Chain Fv (scFv) Anti-Lewis Y Antibody Construct. *Cancer Biother Radiopharm.*, 23(4):411–423, 2008.

KHAN, I., SAEED, K., KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7):908-931, 2019.

KHANTASUP, K., CHANTIMA, W., SANGMA, C., POOMPUTSA, K., DHARAKUL, T. Design and Generation of Humanized Single-chain Fv Derived from Mouse Hybridoma for Potential Targeting Application. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.*, 34(6):404–417, 2015.

KHUSAL, K.G., TONELLI, R.R., MATTOS, E.C., SOARES, C.O., DI GENOVA, B.M., JULIANO, M.A., URIAS, U., COLLI, W., ALVES, M.J. Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* into mammalian cells. *Parasitol Res.*, 114(1):155-65, 2015.

KLOTZ, S.A., DORN, P.L., MOSBACHER, M., SCHIDT, J. Kissing Bugs in the United States: Risk for Vector-Borne Disease in Humans. *Environ Health Insights.*, 8:49–59, 2014.

KREPSTAKIES, M., LUCIFORA, J., NAGEL, C.H., ZEISEL, M.B., HOLSTERMANN, B., HOHENBERG, H., KOWALSKI, I., GUTSMANN, T., BAUMERT, T.F., BRANDENBURG, K., HAUBER, J., PROTZER, U. A New Class of Synthetic Peptide Inhibitors Blocks Attachment and Entry of Human Pathogenic Viruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(11):1654–1664, 2012.

KUMAR, S., KUMAR, R., KHAN, L., MAKHDOOMI, M. A., THIRUVENGADAM, R., MOHATA, M., AGARWAL, M., LODHA, R., KABRA, S. K., SINHA, S., LUTHRA, K. CD4-Binding Site Directed Cross-Neutralizing scFv Monoclonals from HIV-1 Subtype C Infected Indian Children. *Front Immunol.*, 8: 1568, 2017.

KURUP, S. P., TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* flagellum is discarded via asymmetric cell division following invasion and provides early targets for protective CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Host & Microbe*, 16(4), 439–449, 2014.

LAKHRIF, Z., MOREAU, A., HÉRAULT, B., DI-TOMMASO, A., JUSTE, M., MOIRÉ, N., DIMIER-POISSON, I., MÉVÉLEC, M.-N., AUBREY, N. Targeted Delivery of *Toxoplasma gondii* Antigens to Dendritic Cells Promote Immunogenicity and Protective Efficiency against Toxoplasmosis. *Front Immunol*, 9: 317, 2018.

LANTOS, A. B., CARLEVARO, G., ARAOZ, B., DIAZ, P. R., CAMARA, M. de los M., BUSCAGLIA, C. A., BOSSI, M., YU, H., CHEN, X., BERTOZZI, C.R., MUCCI, J., CAMPETELLA, O. Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. *PLoS Pathogens*, 12(4), 2016.

LAUSTSEN, A.H., LAURIDSEN, L.P., LOMONTE, B., ANDERSEN, M.R., LOHSE, B. Pitfalls to avoid when using phage display for snake toxins. *Toxicon*, 126:79-89, 2017.

LEAVER, D.J. Synthesis and Biological Activity of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase and Sterol C24-Methyltransferase Inhibitors. *Molecules*, 23(7): 1753, 2018.

LEE, B.Y., BACON, K.M., BOTTAZZI, M.E., HOTEZ, P.J. Carga econômica global da doença de Chagas: um modelo de simulação computacional. *Lancet Infect Dis.*, 13(4):342-8, 2013.

LEITE, D.I., FONTES, F.V., BASTOS, M.M., HOELZ L.V.B., BIANCO, M.D.C.A.D., De OLIVEIRA, A.P., Da SILVA, P.B., Da SILVA, C.F., BATISTA, D.D.G.J., Da GAMA, A.N.S., PERES, R.B., VILLAR, J.D.F., SOEIRO, M.N.C., BOECHAT, N. New 1,2,3-triazole-based analogues of benznidazole for use against *Trypanosoma cruzi* infection: In vitro and in vivo evaluations. *Chem Biol Drug Des.* May 9, 2018.

LI, X. Chapter 8 - Bioengineering of FGFs and New Drug Developments. *Fibroblast Growth Factors*, 477-558, 2018.

LI, D., HU, S., FAN, Q., BAO, W., ZHOU, W., XU, T., YE, T., LIU, H., SONG, L. Phage display screening of TIGIT-specific antibody for antitumor immunotherapy. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(9):1683-1696, 2019.

LI, J.N., WANG, H., HAN, Y.H., ZHAO, Y.T., ZHOU, H.H., XU, J., LI, L. Novel peptides screened by phage display peptide library can mimic epitopes of the FnBPA-A protein and induce protective immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbiology open*, 8(10), 2019.

LIDANI, K.C.F., BAVIA, L., AMBROSIO, A.R., MESSIAS-REASON, I.J. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.*, 2017, doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607.

LIM, C.C., WOO, P.C.Y., LIM, T.S. Development of a Phage Display Panning Strategy Utilizing Crude Antigens: Isolation of MERS-CoV Nucleoprotein human antibodies. *Scientific Reports*, 9, 2019.

LIMA, M.L., ROMANELLI, M.M., BORBOREMA, S.E.T., JOHNS, D.M., MIGOTTO, A.E., LAGO, J.H., TEMPONE, A.G. Antitrypanosomal activity of isololiolide isolated from the marine hydroid *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa). *Bioorg Chem.*, 89:103002, 2019.

LIU, W., SONG, H., CHEN, Q., YU, J., XIAN, M., NIAN, R., FENG, D. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Molecular Immunology*, 96, 37-47, 2018.

LIU, Q., ZHAO, H., JIANG, Y., WU, M., TIAN, Y., WANG, D., LAO, Y., XU, N., LI, Z. Development of a lytic peptide derived from BH3-only proteins. *Cell Death Discovery*, 2016. doi:10.1038/cddiscovery.2016.8.

LIU, T., LI, B., JIANG, Y., ZHENG, C., ZHANG, L., WANG, Y. Screening and identification of novel specific markers of breast cancer stem cells. *Oncol Lett.* 18(3):2262–2269, 2019.

LOPES, R.S., QUEIROZ, M.A.F., GOMES, S.T.M., VALLINOTO, A.C.R., GOULART, L.R., ISHAKA, R. Phage display: an important tool in the discovery of peptides with anti-HIV activity. *Biotechnology Advances*, 2018.

LOSET, G.A. e SANDLIE, I. Next generation phage display by use of pVII and pIX as display scaffolds. *Methods*, 58 (1): 40-46, 2012.

LU, X., JIANG, D.J., YAN, J.X., MA, Z., LUO, X., WEI, T.L., XU, Y., HE, Q.H. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for Cry1Ab based on phage displayed peptides. *Talanta*, 179(1): 646-651, 2018.

MA, Z., WANG, T., LI, Z., GUO, X., TIAN, Y., LI, Y., XIAO, S. A novel biotinylated nanobody-based blocking ELISA for the rapid and sensitive clinical detection of porcine epidemic diarrhea virus. *J Nanobiotechnology*, 17:96, 2019.

MACHADO, C.M.T., BUENO, L.L., SOUZA, D.M., DE ÁVILA, R.A.M., NGUYEN, C., GRANIER, C., BARTHOLOMEU, C., OLÓRTEGUI, C. C., FUJIWARA, R.T. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. *Parasit Vectors*, 8: 133, 2015a.

MACHADO, C.M.T., DE AVILA, R.A.M., NGUYEN, C., GRANIER, C., BUENO, L.L., CARNEIRO, C.M., SOUZA, D.M., CARNEIRO, R., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., FUJIWARA, R.T. Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries. *Biomed Res Int.* 2015b.

MACLEAN, L.M., THOMAS, J., LEWIS, M.D., COTILLO, I., GRAY, D.W., RYCKER, M. Development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro* assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis.*, 12(7), 2018.

MADISON, M.N., KLESHCHENKO, Y.Y., Nde, P.N., SIMMONS, K.J., LIMA, M.F., VILLALTA, F. Human Defensin  $\alpha$ -1 Causes *Trypanosoma cruzi* Membrane Pore

Formation and Induces DNA Fragmentation, Which Leads to Trypanosome Destruction. *Infect Immun.*, 75(10):4780–4791, 2007.

MALA, J., PUTHONG, S., MAEKAWA, H., KANEKO, Y., PALAGA, T., KOMOLPIS, K., SOOKSAI, S. Construction and sequencing analysis of scFv antibody fragment derived from monoclonal antibody against norfloxacin (Nor155). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 69-76, 2017.

MARCHIORI, M.F., RIUL, T.B., BORTOT, L.O., ANDRADE, P., JUNQUEIRA, G.G., FOCA, G., DOTI, N., RUVO, M., DIAS-BARUFF, M., CARVALHO, I., CAMPO, V.L. Binding of triazole-linked galactosyl arylsulfonamides to galectin-3 affects *Trypanosoma cruzi* cell invasion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(21): 6049-6059, 2017.

MARVIN, D.A., SYMMONS, M.F. e STRAUS, S.K. Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 114(2):80-122, 2014.

MESSENGER, L.A., MILES, M.A., BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(8):995–1029, 2015.

MILLAN C.R., ACOSTA-REYES, F.J., LAGARTERA, L., EBILOMA, G.U., LEMGRUBER, L., NUE, J.J.M., SAPERAS, N., DARDONVILLE, C., DeKONING, H.P., CAMPOS, J.L. Functional and structural analysis of AT-specific minor groove binders that disrupt DNA-protein interactions and cause disintegration of the *Trypanosoma brucei* kinetoplast. *Nucleic Acids Res.*, 45(14):8378–91, 2017.

MOLINA, I., GÓMEZ, J.P.I., SALVADOR, F., TREVIÑO, B., SULLEIRO, E., SERRE, N., POU, D., ROURE, S., CABEZOS, J., VALERIO, L., BLANCO-GRAU, A., SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A., VIDAL, X., PAHISSA, A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, 15;370(20):1899-908, 2014.

MOMENI, A., RASOOLIAN, M., MOMENI, A., NAVAEI, A, EMAMI, S., SHAKER, Z., MOHEBALI, M., KHOSHDEL, A. Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Liposome Res.*, 23(2):134-44, 2013.

MONCAYO, A., SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 2009.

MORENO, É. M., LEAL, S. M., STASHENKO, E. E., GARCÍA, L. T. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 225, 2018.

MORILLA, M.J., PRIETO, M.J., ROMERO, E.L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components?. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(2):213-9, 2005.

- MOTT, A., LENORMAND, G., COSTALES, J., FREDBERG, J.J. BURLEIGH, B.A. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Physiol.* 218(2):315–322, 2009.
- MUCCI, J., CARMONA, S.J., VOLCOVICH, R., ALTCHER, J., BRACAMONTE, E., MARCO, J. D., NIELSEN, M., BUSCAGLIA, C.A., AGUERO, F. Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), 2017.
- MUGNIER, M.R., STEBBINS, C.E., PAPAVALIIOU, F.N. Masters of Disguise: Antigenic Variation and the VSG Coat in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*, 12(9), 2016.
- NAGANO, K., TSUTSUMI, Y. Development of novel drug delivery systems using phage display technology for clinical application of protein drugs. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, 92(5):156–166, 2016.
- NARDY, A.F., FREIRE-DE-LIMA, C.G., MORROT, A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol Res.*, 2015. doi: 10.1155/2015/178947.
- NEIRA, I., SILVA F.A., CORTEZ, M. e YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, 71: 557-561, 2003.
- NELSON, A.L. Antibody fragments. *MAbs.*, 2(1): 77–83, 2010.
- NIXON, A.E., SEXTON, D.J., LADNER R.C. Drugs derived from phage display. From candidate identification to clinical practice. *MAbs*, 6(1):73–85, 2014.
- NORBURY, L. J., BASALAJ, K., BASKA, P., ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, A., KALINOESKA, A., WILKOWSKI, P., WESOŁOWSKA, A., WEDRYCHOWICZ, H. Generation of a single-chain variable fragment phage display antibody library from naïve mice panned against *Fasciola hepatica* antigens. *Exp Parasitol.*, 205:107737, 2019.
- OBISHAKIN, E., STIJLEMANS, B., SANTI-ROCCA, J., VANDENBERGHE, I., DEVREESE, B., MULDERMANS, S., BASTIN, P., MAGES, S. Generation of a Nanobody Targeting the Paraflagellar Rod Protein of Trypanosomes. *PLoS One.*, 9(12), 2014.
- OLIVEIRA, H.C., MICHALOSKI, J.S., DA SILVA, J.F., SCORZONI, L., E SILVA, A.C.A., MARCOS, C.M., ASSATO, P.A., YAMAZAKI, D.S., FUSCO-ALMEIDA, A.M., GIORDANO, R.J., MENDES-GIANNINI, M.J.S. Peptides Derived from a Phage Display Library Inhibit Adhesion and Protect the Host against Infection by *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Front. Pharmacol.*, 7, 2016.
- PABLOS, L. M., OSUNA, A. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infection and Immunity*, 80(7): 2258–2264, 2012.
- PAROLI, A.F., GONZALEZ, P.V., DÍAZ-LUJÁN, C., ONOFRIO, L.I., AROCENA, A., CANO, R.C., CARRERA-SILVA, E.A., GEA, S. NLRP3 Inflammasome and Caspase-

1/11 Pathway Orchestrate Different Outcomes in the Host Protection Against *Trypanosoma cruzi* Acute Infection. *Front Immunol.*, 9: 913, 2018.

PASCUALE, C. A., BURGOS, J. M., POSTAN, M., LANTOS, A. B., BERTELLI, A., CAMPETELLA, O., LEGUIZAMÓN, M. S. Inactive *trans*-Sialidase expression in *iTS-null Trypanosoma cruzi* generates virulent Trypomastigotes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 430, 2017.

PASSERO, L.F., LAURENTI, M.D., TOMOKANE, T.Y., CORBETT, C.E., TOYAMA, M.H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol Res.*, 102(5):1025-33, 2008.

PATRA, J.K., DAS, G., FRACETO, L.F., CAMPOS, E.V.R., RODRIGUEZ-TORRES, M.D.P., ACOSTA-TORRES, L.S., DIAZ-TORRES, L.A., GRILLO, R., SWAMY, M.K., SHARMA, S., HABTEMARIAM, S., SHIN, H.S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 2018.

PECH-CANUL, A.L.C., MONTEÓN, V., OVIEDO, R.L.S. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res.*, 3751403, 2017.

PELLEGRINI, A., GUIÑAZU, N., GIORDANENGO, L., CANO, R.C., GEA, S. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. *Future Microbiol.*, 6(12):1521-33, 2011.

PENG, L., SHANG, W., GUO, P., HE, K., WANG, H., HAN, Z., JIANG, H., TIAN, J., WANG, K., XU, W. Phage Display-Derived Peptide-based Dual-Modality Imaging Probe for Bladder Cancer Diagnosis and Resection Post-Instillation: A Preclinical Study. *Mol Cancer Ther.*, 2018.

PEREIRA, P.C.M., NAVARRO, E.C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 19:34, 2013.

PÉREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I. Chagas disease. *The lancet*, 391(10115):82-94, 2018.

PINHEIRO, ELOAN., BRUM-SOARES, LUCIA., REIS, RENATA., CUBIDES, JUAN-CARLOS. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 50(3):296-300, 2017.

PITA, S., DÍAZ-VIRAQUÉ, F., IRAOLA, G., ROBELLO, C. The Tritryps Comparative Repeatome: Insights on Repetitive Element Evolution in Trypanosomatid Pathogens. *Genome Biology and Evolution*, 11(2):546–551, 2019.

PRASHANT, K.J., IVAN, H.S. Au NPs target cancer. *Nanotoday*, 2, 19-29, 2007.

RAMI, A., BEHDANI, M., YARDEHNAVI, N., HABIBI-ANDOUHI, M., KAZEMI-LOMEDASHT, F. An overview on application of phage display technique in immunological studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7):599-602, 2017.

RAMÍREZ, G., VALCK, C., MOLINA, M.C., RIBEIRO, C.H., LÓPEZ, N., SÁNCHEZ, G., FERREIRA, V.P., BILLETTA, R., AGUILAR, L., MALDONADO, I., CATTÁN, P., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology*, 216(1-2):265-73, 2011.

RAMÍREZ-GONZALEZ, M. G., FLORES-VILLEGAS, L., SALAZAR-SCHETTINO, M., GUTIÉRREZ-CABRERA, A. E., ROJAS-ORTEGA, E., CÓRDOBA-AGUILAR, A. Zombie bugs? Manipulation of kissing bug behavior by the parasite *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 200, 2019.

RAMÍREZ-TOLOZA, G. e FERREIRA, A. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *Front. Microbiol.*, 8:1667, 2017.

ROCHA, F.L. A rede trófica e o papel dos carnívoros silvestres (ordem carnívora) nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2013.

RODRIGUES, M.M., OLIVEIRA, A.C., BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *Journal of Parasitology Research*, (5):507874, 2012.

RUBIN-DE-CELIS, S.S., UEMURA, H., YOSHIDA, N., SCHENKMAN, S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.*, 8:1888–1898, 2006.

SÁENZ-GARCIA, J., YAMANAKA, I. B., PACHECO-LUGO, L. A., MIRANDA, J. S., CÓRNEO, E. S., MACHADO-DE-ÁVILA, R. A., MOURA, J. F., DAROCHA, W. D. Targeting epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* with a peptide isolated from a phage display random library. *Experimental Parasitology*, 210:107830, 2020.

SANDS, M., KRON, M.A., BROWN, R.B. Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis.*, 7(5):625-34, 1985.

SAW, P. E., SONG, E-W. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein Cell*, 10(11):787–807, 2019.

SEOW, J., MORALES, R.V.A., MACRAILD, C.A., KRISHNARJUNA, B., MCGOWAN, S., DINGJAN, T., JAIPURIA, G., ROUET, R., WILDE, K.L., ATREYA, H.S., RICHARDS, J.S., ANDERS, R.F., CHRIST, D., DRINKWATER, N., NORTON, R.S. Structure and Characterisation of a Key Epitope in the Conserved C-Terminal Domain of the Malaria Vaccine Candidate MSP2. *Journal of Molecular Biology*, 429(6), 24, 836-846, 2017.

SCOTT, F.G., KHALAF, A.I., GIORDANI, F., WONG, P.E., DUFFY, S., BARRET, M., AVERY, V.M., SUCKLING, C.J. An evaluation of Minor Groove Binders as anti-*Trypanosoma brucei brucei* therapeutics. *Eur J Med Chem.*, 116, 116-125, 2016.

SHATALOVA, A.V., YAKUBOVA, A.S., PALIMPSESTOV, V.V., ESMAGAMBETOV, I.B. NANOBODIES: STRUCTURE, MANUFACTURING, APPLICATION (REVIEW). *Drug development & registration*, 2019.

SHI, J., VOTRUBA, A.R., FAROKHZAD, O.C., LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.*, 10(9): 3223–3230, 2011.

SIMÕES-SILVA, M.R., DE ARAÚJO, J.S., OLIVEIRA, G.M., DEMARQUE, K.C., PERES, R.B., D'ALMEIDA-MELO, I., BATISTA, D.G.J., DA SILVA, C.F., CARDOSO-SANTOS, C., DA SILVA, P.B., BATISTA, M.M., BAHIA, M.T., SOEIRO, M.N.C. Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. *Biochemical Pharmacology*, 145: 46-53, 2017.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228:1315-1317, 1985.

SOKOLOWSKA, W.A., CHODACZEK, G., CHUDZIAN, J., BOREK, A., ZAKRZEWSKA, M., OTLEWSKI. High-Affinity Internalizing Human scFv-Fc Antibody for Targeting FGFR1-Overexpressing Lung Cancer. *Mol Cancer Res.*, 15(8):1040-1050, 2017.

SOSONIUK, E., VALLEJOS, G., KENAWY, H., GABORIAUD, C., THIELENS, N., FUJITA, T., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A., VALCK, C. *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-ficolin. *Mol. Immunol.* 60, 80–85, 2014.

SOUSA, M. A. de. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 78, 317–333 (1983).

STIJLEMANS, B., CALJON, G., ABBEELE, J.V.D., GINDERACHTER, J.A.V.M MAGEZ, S., DeTREZ, C. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma brucei* within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity, *Front Immunol.*, 7:233, 2016.

SUNTER, J., WEBB, H., CARRINGTON, M. Determinants of GPI-PLC Localisation to the Flagellum and Access to GPI-Anchored Substrates in Trypanosomes. *PLoS Pathog*, 9(8), 2013.

TANIWAKI, N., MACHADO, F.S., MASSENSINI, A., MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi* disrupts myofibrillar organization and intracellular calcium levels in mouse neonatal cardiomyocytes. *Cell and Tissue Research*, 324(3):489-96, 2006.

TARLETON, R.L. Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. *Trends Mol Med.* Oct; 22(10): 835–838, 2016.

TARLETON, R.L. CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Semin Immunopathol.*, 37(3):233–238, 2015.

TAYLOR, M. C., WARD, A., OLMO, F., JAYAWARDHANA, S., FRANCISCO, A. F., LEWIS, M. D., KELLY, J. M. Intracellular DNA replication and differentiation of

*Trypanosoma cruzi* is asynchronous within individual host cells in vivo at all stages of infection. *PLoS Negl Trop Dis.*, 14(3):e0008007, 2020.

TEIXEIRA, A.A.R., DE VASCONCELOS, V.C.S., COLLI, W., ALVES, M.J.M., GIORDANO, R.J. *Trypanosoma cruzi* Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the gp85/Trans-sialidase Proteins. *PLoS Negl Trop Dis.*, 9(9), 2015.

TEIXEIRA, V.L., LIMA, J.C. R., LECHUGA, G.C., RAMOS, C.J.B., PEREIRA, M.C.S., CALVET, C.M., BOURGUIGNON, S.C. Natural products from marine red and brown algae against *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2019. doi.org/10.1016/j.bjp.2019.08.003.

THE LANCET. Chagas disease: still a neglected emergency. THE LANCET, 394(10209):1592, 2019.

TORRICO, F., GASCON, J., ORTIZ, L., ALONSO-VEGA, C., PINAZO, M.J., SCHIJMAN, A., ALMEIDA, I.C., ALVES, F., STRUB-WOURGAFT, N., RIBEIRO, I. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.*, 18(4):419-430, 2018.

US. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV. Selenium Treatment and Chagasic Cardiopathy. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00875173?cond=NCT00875173&draw=2&rank=1>. Acesso em 15 de novembro de 2019.

VALENZUELA, L., SEPÚLVEDA, S., PONCE, I., GALANTI, N., CABRERA, G. The overexpression of TcAP1 endonuclease confers resistance to infective *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes against oxidative DNA damage. *J Cell Biochem.*, Jul;119(7):5985-5995, 2018.

VALLE-REYES, J.S., MELNIKOV, V., DOBROVINSKAYA, O., RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ, A., WOOKEE-ZEA, C., PIMENTEL-RODRIGEZ, V., RUEDA-VALDOVINOS, G., DELGADO-ENCISO, I., LÓPEZ-LEMUS, U.A., ESPINOZA-GOMEZ, F. Antiprotozoal drug nitazoxanide enhances parasitemia, tissue lesions and mortality caused by *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental Parasitology*, 172: 44-50, 2017.

VANDERWEELE, T. J., DING, P. Sensitivity Analysis in Observational Research: Introducing the E-Value. *Ann Intern Med.*, 167(4):268-274, 2017.

VANRELL, M. C., LOSINNO, A. D., CUETO, J. A., BALCAZAR, D., FRACCAROLI, L. V., CARRILO, C., ROMANO, P. S. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), 2017.

VARSHOSAZ, J., FARZAN, M. Nanoparticles for targeted delivery of therapeutics and small interfering RNAs in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 21(42):12022–12041, 2015.

VIEIRA, C.B., PRAÇA, Y.R., BENTES, K.L.S., SANTIAGO, P.B., SILVA, S.M.M., SILVA, G.S., MOTTA, F.N., BASTOS, I.M.D., DeSANTANA, J.M., DeARAÚJO. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors?. *Front Cell Infect Microbiol.*, 8:405, 2018.

VOLPEDO, G., COSTA, L., RYAN, N., HALSEN, G., SATOSKAR, A., OGHUMU, S. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.*, 25:e144118, 2019.

VOLTA, B.J., RUSSOMANDO, G., BUSTOS, P.L., SCOLLO, K., DeRISSIO, A.M., SANCHÉZ, Z., CARDONI, R.L., BUA, J. Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother–child binomial samples. *Acta Tropica*, 147:31-37, 2015.

WANG, L., HU, Y., LI, W., WANG, F., LU, X., HAN, X., LV, J., CHEN, J. Identification of a peptide specifically targeting ovarian cancer by the screening of a phage display peptide library. *Oncol Lett.*, 11(6): 4022–4026, 2016.

WANG, D., LI, W., ZHANG, H., MAO, Q., XIA, H. A targeting peptide improves adenovirus-mediated transduction of a glioblastoma cell line. *Oncol Rep.*, 31(5):2093-8, 2014.

WANG, L., OH, J.Y., KIM, H.S., LEE, W., CUI, Y., LEE, H.G., KIM, Y., KO, J.Y., JEON, Y. Protective effect of polysaccharides from Celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress *in vitro* in Vero cells and *in vivo* in zebrafish. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112: 483-489, 2018.

WANG, L., OH, J.Y., KIM, H.S., LEE, W., CUI, Y., LEE, H.G., KIM, Y., KO, J.Y., JEON, Y. Protective effect of polysaccharides from Celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress *in vitro* in Vero cells and *in vivo* in zebrafish. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112: 483-489, 2018.

WILBRINK, M. H., TEN KATE, G. A., VAN, S. S.L., SANDERS, P., SALLOMONS, E., HAGE, J. A., DIJKHUIZEN, L., KAMERLING, J. P. Galactosyl-Lactose Sialylation Using *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase as the Biocatalyst and Bovine  $\kappa$ -Casein-Derived Glycomacropeptide as the Donor Substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5984–5991, 2014.

WOLFRAM, J., ZHU, M., YANG, Y., SHEN, J., GENTILE, E., PAOLINO, D., FRESTA, M., NIE, G., CHEN, C., SHEN, H., FERRARI, M., ZHAO, J. Safety of nanoparticles in medicine. *Curr Drug Targets.*, 16(14):1671–1681, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact sheet: Chagas disease (American trypanosomiasis). Washington: World Health Organization International; 2016. 166p. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 16 de agosto de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis), 2018. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact->

sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis). Acesso em 16 de agosto de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Neglected tropical diseases. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). Acesso em 16 de agosto de 2019.

XIAOKUN, L. Chapter 8 - Bioengineering of FGFs and New Drug Developments. *Fibroblast Growth Factors*, 477-558, 2018.

YE, X., ZHOU, M., HE, Y., WAN, Y., BAI, W., TAO, S., REN, Y., ZHANG, X., XU, J., LIU, J., ZHANG, J., HU, K., XIE, Y. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by a preS1-binding Peptide. *Scientific Reports*, 6, 2016.

YERAMIAN, P., MESHNICK, S.R., KRUDSOOD, S., CHALERMRUT, K., SILACHAMROOM, U., TANGPUKDEE, N., ALLEN, J., BRUN, R., KWIEK, J.J., TIDWELL, R., LOOAREESUWAN, S. Efficacy of DB289 in Thai patients with *Plasmodium vivax* or acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* infections. *J Infect Dis.*, 192(2):319-22, 2005.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 4(1):101–107, 2009.

ZHONG, J., CHAU, Y. Antitumor activity of a membrane lytic peptide cyclized with a linker sensitive to membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Mol Cancer Ther.*, 7(9):2933-40, 2008.

ZINGALES, B., MILES, M.A., MORAES, C.B., LUQUETTI, A., GUHL, F., SCHIJMAN, A.G., RIBEIRO, I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(6): 828–833, 2014.