

# UNIVERSIDADE SANTO AMARO

## Curso de Medicina

### Declaração de entrega do Trabalho de Conclusão de Curso

Declaro que o trabalho intitulado “Avaliação *in silico* de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi* como alvo imunogênico e farmacológico” realizado pelo aluno Guilherme Vieira Gonçalves está apto para entrega, apresentação e avaliação das bancas nomeadas.

Prof. Dr. Ryan Emiliano da Silva

Assinatura do Orientador do Trabalho

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**

**Curso de Medicina**

**Guilherme Vieira Gonçalves**

***Avaliação in silico de cisteíno-proteases de Trypanosoma cruzi  
como alvo imunogênico e farmacológico***

**São Paulo**

**2025**

**Guilherme Vieira Gonçalves**

**Avaliação *in silico* de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi*  
como alvo imunogênico e farmacológico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Ryan Emiliano da Silva

**São Paulo**

**2025**

G626a

Gonçalves, Guilherme Vieira

Avaliação in silico de cisteíno-proteases de Trypanosoma cruzi como alvo imunogênico

e farmacológico / Guilherme Vieira Gonçalves. - São Paulo, 2025.

28 p. : il; color.

Monografia (Graduação em Medicina) – Universidade Santo Amaro, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Ryan Emiliano da Silva.

Bibliografia incluída

1. Doença de Chagas. 2. Saúde Única. 3. Bioinformática. I. Silva, Ryan Emiliano da. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 620

Elaborado pela Bibliotecária Andréia Alessandra Alves CRB8/7588

**Guilherme Vieira Gonçalves**

**Avaliação *in silico* de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi*  
como alvo imunogênico e farmacológico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Ryan Emiliano da Silva

São Paulo, 12 de dezembro de 2025

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Arianne Costa Baquião

Avaliadora

---

Prof. Dr. Jorge Figueiredo Senise

Avaliador

**Conceito Final**

---

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Doença de Chagas é uma condição clínica que ainda se debruça sobre fortes vulnerabilidades biopsicossociais. Ainda que os índices epidemiológicos da patologia tenham apresentado avanços significativos em razão das iniciativas de âmbito nacional, tal doença permanece sendo um grande desafio para o enfrentamento das enfermidades parasitárias, fazendo-se fundamental a busca por abordagens biotecnológicas que investiguem alvos farmacológicos e moléculas de potencial imunogênico. Neste contexto, merecem destaque as cisteíno-proteases, uma categoria de hidrolase abundante no *Trypanosoma cruzi*, cuja função é associada a sobrevivência, multiplicação, diferenciação e evasão do sistema imune dos hospedeiros. **OBJETIVO:** O seguinte trabalho busca determinar a viabilidade de seletos segmentos peptídicos de cisteíno-proteases derivadas de *Trypanosoma cruzi* como potenciais alvos imunogênicos. **METODOLOGIA:** Inicialmente, sequências nucleotídicas de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi* foram reunidas em banco de dados do NCBI, analisadas por homologia no BLASTn, e traduzidas por meio do BLASTX. Em seguida, a sequência protéica primária foi submetida às análises multiparamétricas do ProtParam ExPasy e ProSite ExPasy. Posteriormente, foram aplicados de forma combinada uma série de critérios de elegibilidade para evidenciar fragmentos proteicos com características bioquímicas desejáveis. Uma vez reunidos, tais parâmetros possibilitaram o delineamento de um grupo de peptídeos candidatos a imunógenos. Na etapa seguinte, tais alvos foram analisados quanto à probabilidade de indução de resposta imune via MHC-1 por intermédio das simulações realizadas pelo Immune Epitope Database. Por fim, a cisteíno-protease foi avaliada em relação à capacidade de ancoragem a outras drogas com atividade tripanocida em investigação, tais como o itraconazol. **RESULTADOS:** A submissão da sequência gênica da cisteíno-protease aos algoritmos do BLASTn e BLASTX permitiu a determinação de um fragmento peptídico composto por 467 aminoácidos. Também foi atestado que seu ponto isoelétrico (pI) equivale a 5.38 e que seu índice de estabilidade é 40.88, conferindo instabilidade à molécula. Finalmente, foram obtidos ainda os valores médios de hidrofobicidade (-0.046) e do índice alifático (74.20). Tais dados predizem que a proteína apresenta boa solubilidade em ambiente celular, satisfatório tempo de meia-vida (30 horas *in vitro*) e pI apropriado para investigações prospectivas de *docking*. Ao final desse processo, a proteína foi analisada sob a ótica de diversos outros critérios bioquímicos, que determinaram a eleição de nove peptídeos com potencial imunogênico promissor. Dentre os candidatos, cinco apresentaram elevada probabilidade de elicitar resposta imune via MHC-1, reforçando a aptidão dos segmentos selecionados como fortes imunógenos. **CONCLUSÃO:** Desse modo, conclui-se que a busca por novos imunógenos e farmacoterapias alternativas para a tripanossomíase é um passo importante para o tratamento adequado da patologia no país. Nesse sentido, é importante que as análises *in silico* propostas no presente trabalho sejam consideradas futuramente, já que podem fornecer informações valiosas para subsidiar estudos prospectivos capazes de ratificar a viabilidade dessas novas terapias no combate à Doença de Chagas.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; Saúde Única; Bioinformática.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Chagas Disease is a clinical condition still marked by significant biopsychosocial vulnerabilities. Although the epidemiological indicators of this pathology have shown significant progress due to nationwide initiatives, the disease remains a major challenge in the fight against parasitic infections. This underscores the importance of exploring biotechnological approaches that investigate pharmacological targets and molecules with immunogenic potential. In this context, cysteine proteases stand out, a category of hydrolases abundantly present in *Trypanosoma cruzi*, whose functions are associated with survival, multiplication, differentiation, and evasion of the host's immune system. **AIM:** This study aims to determine the feasibility of selected peptide segments from *Trypanosoma cruzi*-derived cysteine proteases as potential immunogenic targets. **METHODOLOGY:** Initially, nucleotide sequences of *Trypanosoma cruzi* cysteine proteases were retrieved from the NCBI database, analyzed for homology using BLASTn, and translated using BLASTX. The primary protein sequence was then subjected to multiparametric analysis via ProtParam ExPasy and ProSite ExPasy. Subsequently, a series of eligibility criteria were jointly applied to identify protein fragments with desirable biochemical characteristics. Once compiled, these parameters enabled the selection of a group of nine peptides as candidate immunogens. In the next step, these targets were analyzed for their likelihood of inducing an immune response via MHC-I, through simulations conducted using the Immune Epitope Database. Finally, the cysteine protease was evaluated for its docking capacity with other trypanocidal drugs under investigation, such as itraconazole. **RESULTS:** Submission of the cysteine protease gene sequence to BLASTn and BLASTX algorithms identified a peptide fragment composed of 467 amino acids. It was also determined that its isoelectric point (pI) is 5.38 and that its instability index is 40.88, indicating that the molecule is unstable. Additionally, the average hydrophilicity value (-0.046) and aliphatic index (74.20) were obtained. These data suggest that the protein has good solubility in cellular environments, a satisfactory in vitro half-life (30 hours), and an appropriate pI for prospective docking studies. Following this process, the protein was further analyzed using various biochemical criteria, resulting in the selection of nine peptides with promising immunogenic potential. Among these candidates, five demonstrated a high probability of eliciting an immune response via MHC-I, reinforcing the suitability of the selected segments as strong immunogens. **CONCLUSION:** Therefore, it is concluded that the search for new immunogens and alternative pharmacotherapies for trypanosomiasis is an important step toward the proper treatment of the disease in the country. In this regard, it is important that the in silico analyses proposed in this study be considered in future research, as they may provide valuable insights to support prospective studies capable of confirming the feasibility of these new therapies in combating Chagas Disease.

**Keywords:** Chagas Disease; One Health; Computational Biology.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
1.1. Transmissão, sintomatologia e epidemiologia da Doença de Chagas.....	7
1.2. Desafios para o enfrentamento da doença.....	8
1.3. Moléculas de <i>Trypanosoma cruzi</i> de interesse médico.....	9
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
3.1. Busca de sequências gênicas de cisteíno-proteases de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
3.2. Predição <i>in silico</i> de estruturas de cisteíno-proteases de <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	12
3.3. Escolha <i>in silico</i> de peptídeos derivados de cisteíno-proteases de <i>Trypanosoma cruzi</i> , candidatos a imunógeno em potencial.....	13
3.4. <i>Docking</i> molecular utilizando como alvo farmacológico cisteíno-proteases de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Transmissão, sintomatologia e epidemiologia da Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, popularmente conhecida como Doença de Chagas (DC), configura-se como uma parasitose bastante diversa não somente quanto às sintomatologias, como também aos possíveis quadros clínicos. Essa condição possui como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que apresenta grande polimorfismo a depender de seu estágio evolutivo. O principal vetor ou transmissor do organismo patogênico, principalmente na América do Sul, é o inseto hematófago da espécie *Triatoma infestans*. Todavia, é importante salientar que outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são vetores reconhecidos da enfermidade, e por conseguinte, merecem destaque nas ações de monitoramento epidemiológico (REY *et al.*, 2008).

É relevante destacar que a transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer de diversas maneiras. Dentre elas, são relevantes as formas de contágio através do vetor, em que há contato das fezes contaminadas do percevejo com as mucosas expostas ao coçar a região picada; por transfusão de sangue infectado com o protozoário; por via congênita ou pelo canal do parto; por via oral mediante ingestão de alimentos contendo fragmentos de triatomíneos portadores do agente; por transmissão acidental em laboratório ou por meio de transplante de órgãos de um doador chagásico para um receptor sem a doença. Diante dessa ampla pluralidade de propagação, a prevenção e o controle da patologia analisada se tornam desafiadores, principalmente nas regiões com condições sanitárias precárias (PORTO *et al.*, 2022).

Em relação à sintomatologia, a Doença de Chagas habitualmente se manifesta em duas grandes etapas. Na fase aguda (que pode evoluir para a modalidade crônica), é comum a ocorrência de febre, adenomegalias, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e sinal de Romaña, especialmente em crianças. Já a fase crônica pode permanecer latente durante um grande período de tempo, manifestando alterações eletrocardiográficas, tais como bloqueio do ramo direito, extrassístoles ventriculares e bloqueio atrioventricular. Porém, esse quadro pode progredir para insuficiência cardíaca ou para arritmias graves acompanhadas de palpitações, dispnéia, precordialgia, tosse, síncope e

fenômenos embólicos. Ainda nesse sentido, o parasito pode acometer não só o coração, como também o esôfago e o intestino, gerando o megaesôfago e o megacólon, associados à disfagia, regurgitação, odinofagia, sialose, emagrecimento, constipação, fecaloma, meteorismo e distensão abdominal (PORTO *et al.*, 2022).

Por mais que os índices epidemiológicos da doença tenham apresentado avanços significativos em razão das campanhas nacionais e iniciativas de âmbito internacional, a tripanossomíase ainda se mantém endêmica em diversas regiões da América Latina, especialmente no norte do Brasil. Isso se deve principalmente ao avanço da urbanização e ao desmatamento das regiões florestais alocadas nessa porção do país. Vale ressaltar ainda que correntes migratórias das nações em endemia para outros pontos como o Canadá, Espanha, França, Suíça, Itália, Japão e Austrália têm contribuído significativamente para o aumento de infecções a nível mundial nas últimas décadas. Sendo assim, essa doença merece atenção e investimentos globais e a responsabilidade de controle e tratamento não deve ser delegada apenas aos países mais afetados, já que frequentemente não apresentam condições financeiras e tecnológicas suficientes para tal finalidade (JATENE *et al.*, 2022).

## **1.2. Desafios para o enfrentamento da doença**

Conforme descrito anteriormente, a transmissão da tripanossomíase se debruça sobre vulnerabilidades biopsicossociais. Em países como o Brasil, onde grande parcela da população não é contemplada com as mínimas condições de saneamento básico e habitação, o combate à DC beira o infactível. A estrutura domiciliar nas regiões carentes é precária ao ponto de oferecer ao vetor um ambiente favorável para a sua implantação e proliferação, principalmente quando as residências estão alocadas próximas a áreas de floresta. Portanto, é evidente que os moradores desses locais sobrevivem em circunstâncias incompatíveis com a dignidade humana. Outrossim, a falta de água potável, seja para consumo ou para higiene, viabiliza a manutenção de um ambiente insalubre e propício à propagação de diversas outras patologias (REY *et al.*, 2008).

Além disso, é inegável o descaso das autoridades governamentais frente às demandas básicas dessa população. Tal fator é evidenciado principalmente pela falta de investimentos em vacinas e tratamentos os quais poderiam mitigar os

impactos da tripanossomíase. No Brasil, a terapia farmacológica da doença é baseada exclusivamente no benzonidazol, que não só apresenta baixa ação tripanocida (conferindo uma reduzida eficiência ao fármaco), como também é altamente tóxico ao organismo. Portanto, as atuais intervenções médicas se mostram insatisfatórias. Dessa maneira, é de suma relevância a descoberta de novos alvos terapêuticos que possam oferecer um tratamento mais eficiente e menos nocivo, sejam eles vacinais ou medicamentosos, assim como se objetiva o seguinte trabalho.

### **1.3. Moléculas de *Trypanosoma cruzi* de interesse médico**

O tripomastigota causador da doença pode viabilizar sua infecção no hospedeiro através de múltiplos fatores de virulência. Nesse sentido, é importante mencionar que algumas proteínas presentes no parasito são responsáveis não só pela interiorização do tripanossomo nos tecidos-alvos, como também pela erosão dos revestimentos histológicos do organismo acometido a fim de possibilitar uma invasão a nível hematogênico, dando continuidade ao seu ciclo vital. Por serem imprescindíveis ao protozoário, tais enzimas podem ser bons focos de toxicidade seletiva (FILHO, 2021).

Dentre elas, merecem destaque variadas proteases capazes de garantir plasticidade celular ao protozoário, permitindo que o parasito possa progredir tanto ao longo de seus estádios evolutivos, quanto no seu ciclo vital. Essas moléculas são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos constituintes das cadeias proteicas, gerando dessa forma peptídeos menores e até aminoácidos livres. Por apresentarem elevada diversidade, tais hidrolases foram agrupadas de maneira sistemática de acordo com a posição da ligação peptídica que clivam e também em relação à natureza química de seus sítios ativos. (RAWLINGS *et al.*, 2002; LÓPEZ-OTÍN e BOND, 2008; QUESADA *et al.*, 2009).

A partir dos critérios descritos, essas enzimas podem ser classificadas em exopeptidases e endopeptidases. As primeiras são definidas como proteínas encarregadas de clivar as cadeias polipeptídicas nas extremidades, enquanto as segundas são responsáveis por cisar as porções internas dos peptídeos. Em relação às exopeptidases, se o ponto alvo da fragmentação for próximo à região C-terminal

ou à N-terminal, elas serão chamadas de carboxi e aminopeptidases respectivamente. (GUPTA *et al.*, 2002).

Por outro lado, as endopeptidases são designadas conforme a natureza química do sítio catalítico, podendo ser metaloproteases, serino-proteases, aspártico-proteases ou cisteíno-proteases. (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Sob essa ótica, uma vez que as cisteíno-proteases são as mais abundantes dentre as hidrolases mencionadas, elas representam elevada importância médica e terapêutica no combate à DC. Neste grupo, algumas representam significativos fatores de virulência, pois estão envolvidas na sobrevivência, multiplicação, diferenciação do tripanossomo, e também na evasão do sistema imune. Portanto, a inativação de tais enzimas é potencialmente um dos caminhos para promover um tratamento mais eficiente e menos tóxico aos pacientes com tripanossomíase, fator que contribuiria para uma expressiva melhora na qualidade de vida de uma população cercada de vulnerabilidades sociais (BONALDO *et al.*, 1991).

## 2. OBJETIVO

O seguinte trabalho busca determinar a viabilidade de seletos segmentos peptídicos de cisteíno-proteases derivadas de *Trypanosoma cruzi* como potenciais alvos imunogênicos. Para tanto, tais proteínas serão analisadas a partir de critérios bioquímicos, conformacionais e estereoscópicos, gerando dessa forma fragmentos proteicos que serão posteriormente submetidos a inquéritos de *docking* molecular.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Busca de sequências gênicas de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi*

As proteínas avaliadas são resultado da expressão de genes alocados no genoma do *Trypanosoma cruzi*. Uma vez transcritas e traduzidas, essas sequências de nucleotídeos deram origem às cisteíno-proteases de grande relevância na patogenicidade da doença em questão. Isso posto, tais cadeias nucleotídicas foram reunidas através de algoritmos de busca encontrados no Nucleotide NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Após esse procedimento, as sequências obtidas passaram por mecanismos de procura de similaridade do BLASTn, responsáveis por determinar a validade dos fragmentos submetidos (ALTSCHUL *et al.*, 1997). A investigação da homologia permitiu agrupar as cadeias nucleotídicas completas dos genes das cisteíno-proteases, as quais foram ratificadas pela verificação da paridade entre as trincas nucleotídicas presentes e os códons de iniciação e parada, que demarcam o processo de tradução celular.

#### 3.2. Predição *in silico* de estruturas de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi*

A cadeia nucleotídica foi integralmente remetida às análises feitas pelo EXPASy Translate e pelo BLASTx. Através destes, foi possível a obtenção do encadeamento sequencial dos aminoácidos presentes na proteína, também definido como sequência primária. Após isso, o segmento resultante foi processado na plataforma BLASTp, capaz de reunir peptídeos com conformações estruturais fortemente semelhantes entre si mediante comparação com as proteínas armazenadas no Protein Data Bank (PDB) (ALTSCHUL *et al.*, 1997; BERMAN *et al.*, 2000).

Em seguida, a sequência primária de aminoácidos originada foi verificada pelas ferramentas do ProtParam contido no ExPaSy (GASTEIGER *et al.*, 2003). Por meio desta, o fragmento foi examinado tendo como base diversos critérios bioquímicos, dentre os quais são relevantes: estimativa de meia-vida, quantidade e constituição dos aminoácidos, coeficiente de extinção, nível de hidrofobicidade, taxa

de instabilidade baseados em dipeptídeos de comportamento conhecido, índice alifático, composição atômica e peso molecular. Ainda nesse sentido, os locais correspondentes aos sítios catalíticos foram identificados por intermédio dos instrumentos contemplados no Prosite ExPASy (SIGRIST *et al.*, 2002). Aquela mesma cadeia de aminoácidos serviu de substrato para previsão não só das regiões onde as estruturas secundárias de folhas  $\beta$ -pregueadas e  $\alpha$ -hélices ocorrem, como também da localização celular compartimentalizada da enzima. Esse resultado foi subsidiado pelos algoritmos dispostos no DeepLoc-1.0, em que foi usada a matriz de substituição BLOSUM62 (ALMAGRO ARMENTEROS *et al.*, 2017).

Ao final das verificações envolvendo as sequências primárias, tais segmentos foram importantes pontos de partida para a definição das correspondentes estruturas tridimensionais. Isso foi feito a partir da conjugação entre diferentes recursos computacionais, como o I-TASSER (que organiza hierarquicamente a estrutura e a função de proteínas), Raptor X (capaz de inferir a participação e a determinação de domínios peptídicos) e PyMOL (encarregado da modelagem estrutural) (ZHANG, 2008, KÄLLBERG *et al.*, 2012, FAURE *et al.*, 2019).

### **3.3. Escolha *in silico* de peptídeos derivados de cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi*, candidatos a imunógeno em potencial**

Quando comparadas, a sequência linear de aminoácidos e a conformação tridimensional contribuíram tanto para identificação de diversas regiões peptídicas de interesse, quanto para seleção manual do segmento protéico munido das melhores características de um peptídeo candidato a imunógeno vacinal. Para essa escolha, foram utilizados como critérios de inclusão: acessibilidade física da região, presença ou ausência de domínios peptídicos, existência de  $\alpha$ -hélices ou de folhas  $\beta$ -pregueadas, tamanho, solubilidade, redundância consecutiva de aminoácidos, exposição na superfície da proteína, polaridade, participação de resíduos de cisteína na parte interna do segmento, presença ou ausência de glutamina e asparagina na região N-terminal ou de prolina e glicina na porção C-terminal, e por fim, existência ou não do motivo RGD (arginina - glicina - aspartato). A combinação entre todos esses parâmetros foi pertinente para definir o fragmento proteico candidato a imunógeno. Na etapa subsequente, os peptídeos elegíveis foram avaliados quanto à

capacidade de elicitar resposta imune via MHC-I através das simulações realizadas pelo Immune Epitope Database, a fim de reforçar potencial imunógeno das moléculas selecionadas (CALIS. *et al*, 2013).

### **3.4. Docking molecular utilizando como alvo farmacológico cisteíno-proteases de *Trypanosoma cruzi***

A determinação dos arranjos tridimensionais das moléculas de cisteíno-proteases foi integrada a análises complementares voltadas a ferramentas de *docking* molecular. Nesse sentido, foram utilizados os algoritmos do SwissDock, disponíveis em <http://www.swissdock.ch/>, a fim de realizar as simulações farmacocinéticas de ancoragem mencionadas. O refinamento desse processo foi feito com o auxílio do software de interações estéricas ChimeraX, em que as conformações enzimáticas do *Trypanosoma cruzi* assumiram função de *targets*, enquanto as moléculas ligantes foram variados compostos farmacológicos com estruturas dispostas nos softwares anteriormente citados. Levando tais combinações em consideração, foram analisadas as contagens de clusters e também os valores relativos às suas forças de interação, no intuito de verificar a efetividade de uma combinação que mereça investigação prospectiva em exames terapêuticos futuros.

Com a finalidade de tornar a metodologia proposta didática, apresenta-se o seguinte fluxograma que elucida os estágios sequenciais compreendidos na execução do presente projeto de pesquisa:

**Imagem 1 - Fluxograma com representação das etapas metodológicas que compõem o delineamento experimental do projeto de pesquisa**



#### 4. RESULTADOS

Inicialmente, foi realizada uma busca pelas sequências nucleotídicas de uma cisteíno-protease importante para a patogenicidade da Doença de Chagas, a cruzipaína. Conforme descrito anteriormente, a pesquisa do gene codificador de tal proteína foi feita através do banco de dados NCBI, que viabilizou a obtenção completa dos segmentos de DNA associados a esse peptídeo.

Em seguida, a fim de garantir que o encadeamento de nucleotídeos selecionado contemplava integralmente o gene de interesse, foi verificada a presença dos códons de iniciação (ATG) e de parada (TAG, TGA e TAA) no começo e no fim do fragmento de DNA respectivamente.

Com a confirmação do sequenciamento adequado do gene, tornou-se possível a submissão da cadeia nucleotídica completa aos algoritmos do ExPASy Translate, capazes de predizer a cadeia primária dos aminoácidos que fazem parte da estrutura da cruzipaína. Dessa maneira, a reunião de todos os processos anteriores permitiu o surgimento dos seguintes resultados parciais:

**Tabela 1 - Cruzipaína e seu respectivo encadeamento primário de aminoácidos**

Proteína	Sequência Primária de Aminoácidos
Cruzipaína (UBT23809.1)	<p>5' Met S G W A R A L S L A A V L V V Met A C L V P A A T A S L H A  E E T L A S Q F A E F K Q K H G R V Y E S A A E E A F R L S V F R  E N L F L A R L H A A A N P H A T F G V T P F S D L T R E E F R S  R Y H N G A A H F A A A Q E R A R V P V N V E V V G A P A A V D  W R A R G A V T A V K D Q G Q C G S C W A F S A I G N V E C Q  W F L A G H P L T N L S E Q Met L V S C D K T D S G C G G G L  Met N N A F E W I V Q E N N G A V Y T E D S Y P Y A S G E G I S P  P C T T S G H T V G A T I T G H V E L P Q D E A Q I A A W L A V N  G P V A V A V D A S S W Met T Y T G G V Met T S C V S E Q L D H  G V L L V G Y N D S A A V P Y W I I K N S W T A Q W G E D G Y I R  I A K G S N Q C L V K E E A S S A V V G G P G P T P E P T T T T T  T S A P G P S P S Y F V Q Met S C T D A A C I V G C E N V T L P T  G Q C L L T T S G V S A I V T C G A E T L T E E V F F A S T H C S  G P S V R S S V P L N Q C N W L L R G S V E F F C G S S S S G R  L A D V D R Q R R Y Q P Y H S R H R R L Stop 3'</p>

Fonte: O autor, 2023. Fonte dos dados: ExPASy Translate.

**Tabela 2 - Composição aminoacídica da cruzipaina com suas respectivas proporções**

	Aminoácido		Número de resíduos	Percentual de Composição na Sequência	Percentual de Composição por Grupo
Grupos R apolares alifáticos	Alanina	Ala (A)	58	12,42%	
	Glicina	Gly (G)	40	8,56%	
	Isoleucina	Ile (I)	11	2,35%	
	Leucina	Leu (L)	31	6,64%	45,61%
	Metionina	Met (M)	7	1,50%	
	Prolina	Pro (P)	23	4,92%	
	Valina	Val (V)	43	9,20%	
Grupos R aromáticos	Fenilalanina	Phe (F)	17	3,64%	
	Tirosina	Tyr (Y)	12	2,57%	8,56%
	Triptofano	Trp (W)	11	2,35%	
Grupos R polares não carregados	Asparagina	Asn (N)	17	3,64%	
	Cisteína	Cys (C)	17	3,64%	
	Glutamina	Gln (Q)	18	3,85%	27,62%
	Serina	Ser (S)	43	9,20%	
	Treonina	Thr (T)	34	7,28%	
Grupos R com carga positiva	Histidina	His (H)	13	2,78%	
	Arginina	Arg (R)	22	4,70%	9,00%
	Lisina	Lys (K)	7	1,50%	
Grupos R com carga negativa	Aspartato	Asp (D)	14	3,00%	
	Glutamato	Glu (E)	29	6,21%	9,21%

Em sequência, a molécula completa da cruzipaína foi enviada à ferramenta Prosite do ExPASy para predição de suas regiões conservadas. Após esse processo, a proteína foi avaliada sob a ótica de diversos critérios de inclusão, a fim de evidenciar os segmentos peptídicos com maior potencial imunogênico. Nesse sentido, foram selecionadas as sequências com tamanho entre 10 e 15 aminoácidos, ponto isoelétrico distante de 7, elevado tempo de meia-vida (em reticulócitos *in vitro*), estáveis e com adequada hidropaticidade (determinada pelo índice GRAVY, que deve ser preferencialmente negativo). Foram desclassificados da seleção os fragmentos com repetições consecutivas de aminoácidos, com presença de mais de dois resíduos de cisteína na parte interna do segmento, com ocorrência de glutamina e asparagina na região N-terminal ou de prolina e glicina na porção C-terminal, e por fim, aqueles com domínios RGD (arginina - glicina - aspartato). A união dos critérios mencionados está exibida no **Tabela 3**.

**Tabela 3 - Critérios bioquímicos definidos para seleção dos candidatos imunógenos**

Encadeamento primário de aminoácidos da protease selecionada	
<p>5' MSGWARALSLAAVLVVMACLVPAATASLHAEETLASQFAEFKQKHGRVYESAAEEAFRLSVFRENLFRLARLHAAANPHATFGVTPFSDLTREEFRSRYHNGAAHFAAAQERARVPVNVVEVVGAPAAVDWRARGAVTAVKDGQCGSCWAFSAIGNVECWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDKTDSGGGGMLMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPPYASGEGISPPCTTSGHTVGATITGHVELPQDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGVMTSCVSEQLDHGVLLVGYNDSAAVPYWIKNNSWTAQWGEDGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVVGGPGPTPEPTTTTTTAPGPSPSYFVQMSCTDAACIVGCENVTLP TGQCLLTTSGVSAIVTCGAETLTEE VFFASTHCSGPSVRSSVPLNQCNWLLRGSVEFFCGSSSSGRLADVDRQRRYQPYHSRHRRL Stop 3'</p>	
■ Regiões conservadas entre espécies	■ Cisteínas
■ Domínios RGD	■ Glutamina e asparagina
■ Repetições consecutivas de resíduos	■ Prolina e glicina

Fonte: o autor, 2023. Fonte dos dados: ProtParam, ExPASy.

Desse modo, a combinação dos fatores mencionados anteriormente viabilizou a eleição de nove peptídeos candidatos a imunógenos:

**Tabela 4 - Peptídeos elegíveis a alvos imunogênicos baseado nos critérios bioquímicos definidos**

Sequências Elegíveis	Crítérios Bioquímicos
VDWRAR <b>G</b> AVTAVKD	<b>PI:</b> 8,72 <b>Meia-vida:</b> 100 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,279
TLAS <b>Q</b> FAEFK <b>Q</b> KH	<b>PI:</b> 8,29 <b>Meia-vida:</b> 7,2 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,769
LAS <b>Q</b> FAEFK <b>Q</b> KH	<b>PI:</b> 8,60 <b>Meia-vida:</b> 5,5 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,775
<b>P</b> HATF <b>G</b> VTP <b>P</b> FSD	<b>PI:</b> 5,08 <b>Meia-vida:</b> >20 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,075
<b>G</b> VTP <b>P</b> FSDLTR	<b>PI:</b> 5,84 <b>Meia-vida:</b> 30 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,140
VDWRAR <b>G</b> AVT	<b>PI:</b> 9,57 <b>Meia-vida:</b> 100 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,250
AG <b>H</b> PLT <b>N</b> LSE <b>Q</b>	<b>PI:</b> 5,24 <b>Meia-vida:</b> 4,4 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,709
<b>G</b> <b>C</b> EN <b>V</b> TL <b>P</b> T <b>G</b> <b>Q</b>	<b>PI:</b> 4,00 <b>Meia-vida:</b> 30 horas <b>Estabilidade:</b> estável <b>GRAVY:</b> -0,345

GRLADVDRQR

PI: 9,51  
 Meia-vida: 30 horas  
 Estabilidade: estável  
 GRAVY: -1,460

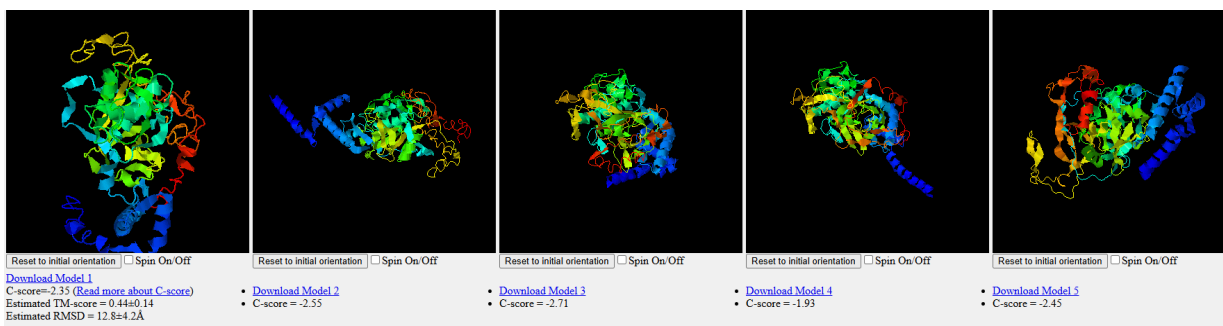
Fonte: o autor, 2024. Fonte dos dados: ProtParam, Expasy.

A submissão das sequências proteicas aos algoritmos do IEDB sugeriram que o primeiro peptídeo é o que apresenta maior probabilidade de elicitar resposta imune no hospedeiro, além de ter características bioquímicas satisfatórias para figurar como um bom alvo vacinal (pl de 8,72, meia-vida de 100 horas, boa estabilidade e solubilidade adequada em ambiente celular, com GRAVY de -0,279).

Posteriormente, o encadeamento primário dos 467 aminoácidos foi remetido aos algoritmos I-TASSER no intuito de gerar a conformação tridimensional da cruzipaína, conforme a **Imagem 3**.

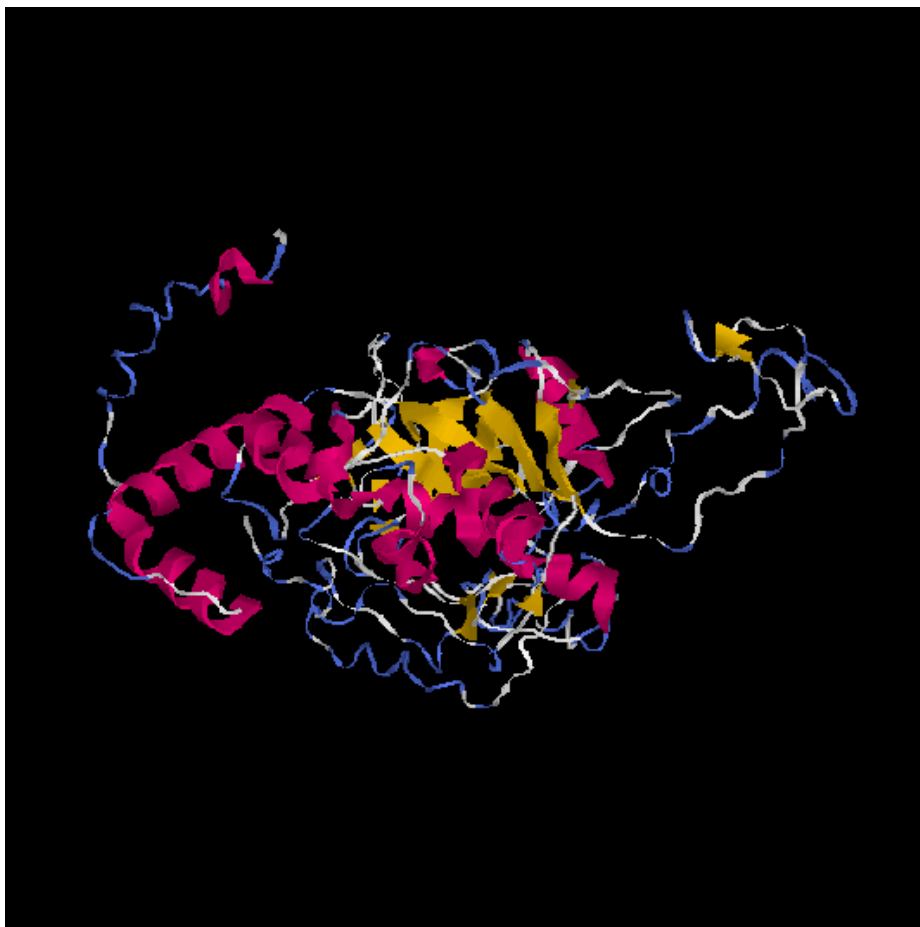
Para determinar a estrutura estereoscópica mais adequada para submissão aos inquéritos de *docking* molecular, foi necessário avaliar o *C-score* dos modelos finais apresentados pela plataforma. Nesse sentido, a estrutura selecionada foi a de maior pontuação, já que prediz maior qualidade, assertividade e semelhança com sua forma nativa dentre os modelos gerados. Sendo assim, a estrutura escolhida foi a de número 1.

**Imagem 2 - Captura de tela dos modelos gerados pelo I-TASSER e seus respectivos C-scores**



Com isso, o modelo tridimensional da cruzipaína pôde ser definido da seguinte maneira:

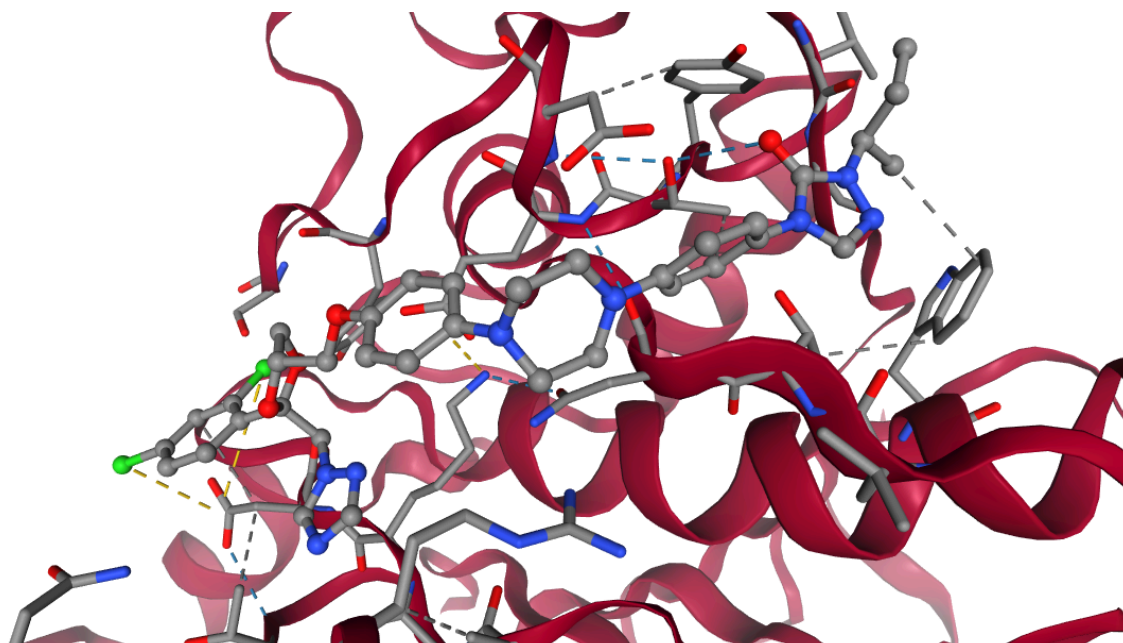
Imagem 3 - Estrutura tridimensional da cruzipaina gerada pelo I-TASSER.



Em seguida, para selecionar um dos fármacos com potencial atividade tripanocida, foi realizada uma revisão das literaturas disponíveis nos bancos de dados do Pubmed e Cochrane Library. Para tanto, a busca utilizou os descritores “*Chagas Disease*” e “*Drug Therapy*”, intercalados pelo operador booleano “*and*”. Foram incluídos na análise apenas artigos dos últimos 10 anos, tanto no idioma inglês, quanto português. Ao final desse processo, foi possível escolher o itraconazol como ligante na etapa de *docking*. O modelo do itraconazol compatível com os algoritmos do SwissDock foi adquirido nos buscadores nativos do próprio software de ancoragem. Por fim, o alvo e o ligante foram remetidos e preparados para a ancoragem na plataforma do SwissDock. O *docking* pôde evidenciar a presença de ligações iônicas e pontes de hidrogênio (duas importantes interações de natureza covalente) entre a cisteíno-protease e o itraconazol, sugerindo boa ancoragem entre ambas as moléculas. Também foi possível atestar a existência de interações

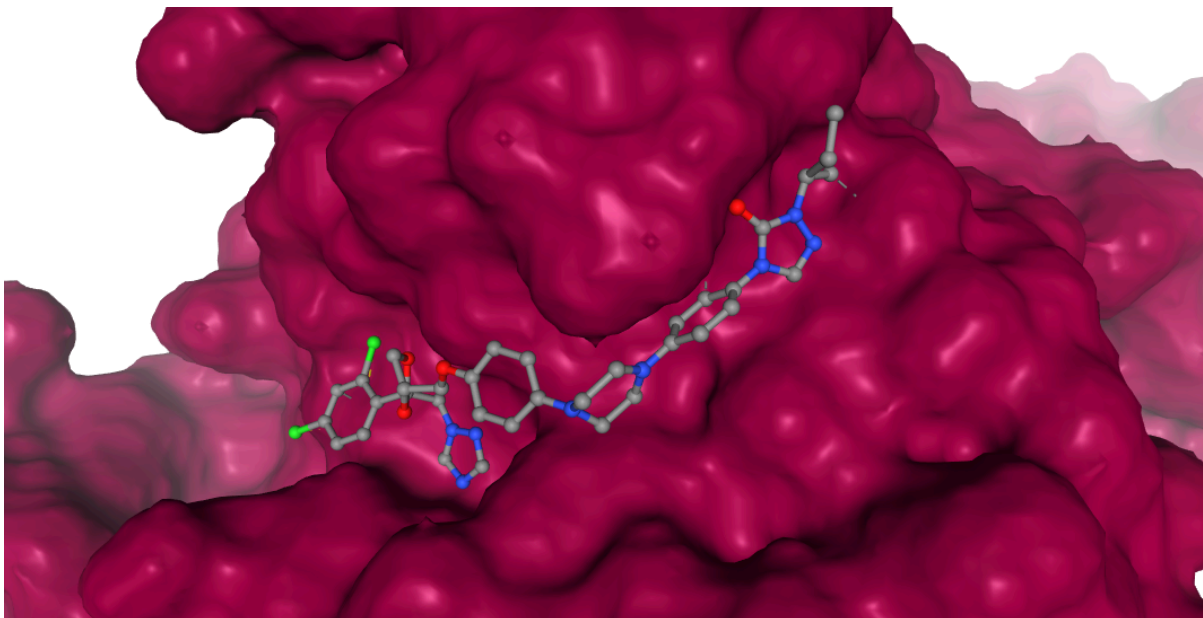
hidrofóbicas entre o fármaco e a cisteíno-protease, sugerindo a formação de interações farmacocinéticas com estabilidade satisfatória. Por fim, as maiores forças de afinidade estimadas pelo software entre ambas as moléculas foram de -8,251 e -8,113 kcal/mol, evidenciando uma ligação de alta intensidade entre o ligante e o alvo. Dessa maneira, os inquéritos de reposicionamento farmacológico puderam credenciar o itraconazol como um alvo terapêutico promissor no contexto da Doença de Chagas, principalmente em razão de sua maior acessibilidade e menor toxicidade quando comparado ao arsenal terapêutico padrão da patologia em questão.

**Imagem 4 - Itraconazol estabelecendo interações iônicas (linha tracejada amarela), pontes de hidrogênio (linha tracejada azul) e contatos hidrofóbicos (linha tracejada cinza)**



Fonte: o autor, 2024. Fonte dos dados: SwissDock, SwissDrugDesing.

**Imagem 5 - Ancoragem do itraconazol na superfície da cruzipaina**



Fonte: o autor, 2024. Fonte dos dados: SwissDock, SwissDrugDesing.

## 5. DISCUSSÃO

Diante do cenário de vulnerabilidades socioeconômicas que envolve a Doença de Chagas, vale ressaltar que é fundamental a busca por novos alvos imunogênicos e tratamentos alternativos eficazes, acessíveis e menos tóxicos quando comparados ao benznidazol. Para esse fim, diversos estudos experimentais têm sido realizados no intuito de propor diferentes classes de fármacos que podem ser incluídas ao arsenal terapêutico da tripanossomíase, revelando resultados promissores acerca de suas atividades antiparasitárias.

Dentre tais fármacos, merece destaque o itraconazol, composto pertencente ao grupo dos imidazóis de nova geração, cuja eficácia no tratamento da Doença de Chagas têm sido atestada principalmente em associação a outras drogas com ação tripanocida semelhante (VILLAR *et al.*, 2014). Tal cenário é possível graças ao mecanismo de inibição de enzimas líticas essenciais à patogenicidade do tripomastigota, sendo capaz não só de reduzir a carga parasitária dos pacientes a longo prazo, como também de atuar sinergicamente com outros medicamentos utilizados no tratamento da doença em questão, como o benznidazol (SÁNCHEZ *et al.*, 1994; CUNHA *et al.*, 2019).

Além disso, o desenvolvimento de novos alvos vacinais figura como um passo importante na prevenção da Doença de Chagas, principalmente em um cenário em que as drogas disponíveis para o tratamento são subótimas. Nesse sentido, pesquisas e investimentos na área podem contribuir para a diminuição da morbimortalidade da tripanossomíase, reduzindo os onerosos gastos do sistema público de saúde no manejo tanto da forma aguda, como também das complicações crônicas da doença (comprometendo principalmente o coração, cólon e esôfago), as quais frequentemente demandam intervenções mais complexas e caras (PINAZO *et al.*, 2024). Portanto, é importante que os alvos proteicos eleitos no presente trabalho sejam considerados em estudos futuros que possam melhor avaliar seu grau de imunogenicidade.

## 6. CONCLUSÃO

Por fim, conclui-se que a busca por novos imunógenos e farmacoterapias alternativas para a tripanossomíase é um passo importante para o tratamento adequado da patologia no país. Nesse sentido, é importante que as análises *in silico* propostas no presente trabalho sejam consideradas futuramente, já que podem fornecer informações valiosas para subsidiar estudos prospectivos capazes de ratificar a viabilidade dessas novas terapias no combate à Doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMAGRO ARMENTEROS J. J. *et al.* DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387-3395, 2017.

ALTSCHUL S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-4021, 1997.

BERMAN H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BONALDO M. C. *et al.* Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 44-51, 1991.

BUGNON, M. *et al.* SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. **Nucleic Acids Research**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae300>. Acesso em: 31 jul. 2024.

CALIS, J. J. A. *et al.* Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 1, p. 361, 2013.

CUNHA, E. L. A. *et al.* Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 204, p. 107711, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.05.005.

EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.

FAURE G. *et al.* iPBAvizu: a PyMOL plugin for an efficient 3D protein structure superposition approach. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 14, n. 5, 2019.

FILHO, Geraldo B. **Bogliolo - Patologia**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

GASTEIGER E. *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.

GUPTA R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381-395, 2002.

JATENE, Ieda B.; FERREIRA, João Fernando M.; DRAGER, Luciano F.; *et al.* **Tratado de cardiologia SOCESP**. 5ª edição. Barueri: Manole, 2022.

KÄLLBERG M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1511-1522, 2012.

LÓPEZ-OTÍN C.; BOND J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.

PINAZO, M. J. *et al.* Challenges and advancements in the development of vaccines and therapies against Chagas disease. **The Lancet Microbe**, **100972**. **Advance online publication**, 2024. DOI: 10.1016/j.lanmic.2024.100972.

PORTO, Celmo C.; PORTO, Arnaldo L. **Clínica Médica na Prática Diária**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.

QUESADA V. *et al.* The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 239-243, 2009.

RAWLINGS N. D.; O'BRIEN E.; BARRETT A. J. MEROPS: the protease database. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 343-346, 2002.

SILVA-LÓPEZ R. E. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SIGRIST C. J. *et al.* PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 3, n. 3, p. 265-274, 2002.

SÁNCHEZ, G. *et al.* Treatment with allopurinol and itraconazole changes lytic activity in patients with chronic, low grade *Trypanosoma cruzi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 438-439, 1995. DOI: 10.1016/0035-9203(95)90046-2.

VILLAR, J. C. *et al.* Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 5, 2014. DOI: 10.1002/14651858.CD003463.pub2.

ZHANG Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 40, 2008.