



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**INTEGRAÇÃO DE ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS E EXPERIMENTAIS NA
CARACTERIZAÇÃO DA METALOPROTEASE THIMET OLIGOPEPTIDASE DE
*Trypanosoma cruzi***

VERÔNICA LUCAS SEQUEIRA DA SILVA

Brasília - DF, 2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**INTEGRAÇÃO DE ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS E EXPERIMENTAIS NA
CARACTERIZAÇÃO DA METALOPROTEASE THIMET OLIGOPEPTIDASE DE
*Trypanosoma cruzi***

VERÔNICA LUCAS SEQUEIRA DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: **Profa. Dra. Izabela
Marques Dourado Bastos**

Coorientadora: **Profa. Dra. Flávia Nader
Motta**

Brasília - DF, 2024

*"Quando não houver caminho
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando que se faz o caminho
Quando não houver desejo
Quando não restar nem mesmo dor
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós, aonde Deus colocou."*

(Sérgio Britto)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pois sem eles eu não existiria,
a mim mesma por não desistir
ainda que tudo parecesse perdido
e a todas as meninas que um dia
sentiram que não eram suficientes
ou merecedoras de algo maior.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por sua infinita bondade, por ter me feito do jeito que sou e por fazer com que seus planos sejam sempre maiores que os meus.

À minha orientadora, Dra. Izabela Bastos, pela oportunidade, pelos aprendizados e por confiar na minha capacidade e trabalho ao longo desses anos.

À minha coorientadora, Dra. Flávia Nader Motta, pelos conselhos de "velha", por todo o cuidado comigo, pelas incontáveis risadas e anedotas e por tornar os dias mais leves. Você foi um dos motivos que me fizeram não desistir antes da hora.

Aos meus queridos pais, Claudete e Jenner, por seu amor incondicional por mim, por sempre fazerem o possível e o impossível para que eu tivesse as melhores oportunidades e condições de vida, por seu exemplo de benevolência e caridade, por todo suporte financeiro e por todo apoio emocional, mesmo quando a única coisa que vocês pudessem fazer fosse sofrer comigo e enxugar minhas lágrimas. Amo vocês.

Aos meus colegas de trabalho, Amanda (minha amiga desde a iniciação científica e fiel escudeira), Dani, Kaio, Nath, Alê, Renan, Andrey, Gilberto, Tarcila, Gabriel, Karen, Giulia, Bia e Gabi, que foram ganhando meu coração ao longo do caminho. Agradeço pelas longas e frutíferas fofocas na copa, pelas risadas, pelas dicas e pelo suporte em momentos difíceis.

Aos demais professores e integrantes do LIPH por todo aprendizado, companheirismo e formação.

À Dra. Melina Mottin pelos ensinamentos, pela paciência, pelas longas videochamadas e por me mostrar uma nova área que tanto despertou meu interesse ao longo dos anos.

Ao Dr. Aisel Garay pelas aulas de biofísica, muitas vezes (literalmente) desenhando se fosse preciso para que eu pudesse entender a lógica por trás daquilo, pelo auxílio com os experimentos e metodologias complicadas de entender, por sempre se mostrar à disposição, pelo bom humor e suporte.

Ao meu irmão, Douglas, pela amizade, companheirismo, por ser meu mordomo particular, buscando água para que eu não ficasse desidratada ao longo do processo de escrita deste trabalho e por aguentar meu mau humor calado (às vezes não tão calado).

Aos meus valorosos amigos, Isadora, Guilherme, Laís, Elaine, Júlio, Stefane e Lucas, toda minha gratidão pelos conselhos, escuta, validação e risadas. Amo vocês e agradeço a nossa amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio e financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	16
1.2 CICLO DE VIDA E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA.....	18
1.3 TRATAMENTO	20
1.4 PROTEASES.....	22
1.4.1 Classificação através do mecanismo químico de catálise.....	23
1.4.2 Classificação através do tipo e posição da reação catalisada.....	25
1.4.3 Classificação através da estrutura molecular e homologia.....	25
1.5 METALOPROTEASES	26
1.6 THIMET OLIGOPEPTIDASE	27
1.6.1 Thimet oligopeptidase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
1.7 ABORDAGENS <i>IN SILICO</i> NO ESTUDO DAS PROTEASES	33
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	37
4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA.....	37
4.3 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS.....	37
4.4 ÁRVORE FILOGENÉTICA	38
4.5 PREDIÇÃO DE MODELOS TRIDIMENSIONAIS DA PROTEÍNA	38
4.6 AVALIAÇÃO DOS MODELOS TRIDIMENSIONAIS DA PROTEÍNA.....	38
4.7 PREPARAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL DA TOPTC.....	39
4.8 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS.....	40
4.9 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	40
4.10 ANÁLISES DE INSPEÇÃO VISUAL	41
4.11 TRIAGEM <i>IN VITRO</i> DOS COMPOSTOS SELECIONADOS	41
4.12 EXPRESSÃO DA RTOPTC.....	42
4.13 PURIFICAÇÃO DA RTOPTC.....	42
4.14 ANÁLISE EM SDS-PAGE	43
4.15 ANÁLISES POR WESTERN BLOT OU IMMUNOBLOTTING.....	43
4.16 TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	44
4.17 ENSAIO <i>IN SILICO</i> DE AFINIDADE A DIFERENTES ÍONS METÁLICOS	44
4.18 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE AFINIDADE A DIFERENTES ÍONS METÁLICOS.....	45
4.19 TESTE DE OXIDAÇÃO	45
4.20 DIGESTÃO DOS PEPTÍDEOS HORMONAIS PARA ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSA.....	45
4.21 TESTE DE DESNATURAÇÃO	45

4.22 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA	47
5.2 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E FILOGENIA.....	49
5.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA.....	53
5.4 THIMET OLIGOPEPTIDASE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> É DEPENDENTE DE ZINCO PARA SEU FUNCIONAMENTO	54
5.5 EXPOSIÇÃO A AGENTES OXIDANTES.....	55
5.6 ESTABILIDADE TÉRMICA DA TOPTC.....	57
5.7 TESTE DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO.....	58
5.8 TOPTC É UMA ENZIMA MONOMÉRICA	58
5.9 TOPTC É CAPAZ DE CLIVAR PEPTÍDEOS HORMONAIS HUMANOS.....	60
5.10 PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS.....	64
5.11 INSPEÇÃO VISUAL DO MODELO	64
5.12 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM <i>DOCKING</i> E TESTES <i>IN VITRO</i>	65
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO.....	75
8 PERSPECTIVAS.....	76
9 REFERÊNCIAS	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AMC	7-amino-4-metilcumarina
Anti-His	Anticorpo anti-cauda de Histidina
Cpp	N-[1-(R,S)carboxi-3-fenilpropil]
DC	Doença de Chagas
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
IPTG	Isopropil- β -D-galactopiranosídeo
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
JA-2	N-[1-(R, S)-carboxi-3-fenilpropil]-Ala-Aib-Tyr-p-aminobenzoato (onde Aib é ácido alfa-aminoisobutírico)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	Protein Data Bank (Banco de dados de Proteínas)
R2	3-[(2S)-1-[(3R)-3-(2-clorofenil)-2-(2-fluorofenil)pirazolidina-1-il]-1-oxopropan-2-il]-1-(adamantan-2-il)ureia
rTOPTc	Thimet Oligopeptidase recombinante de <i>T. cruzi</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TBS-T	Solução Salina Tamponada com Tris e Tween
TOP	Thimet Oligopeptidase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição global da doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018. Fonte: Adaptado de World Health Organization, 2018. 16
- Figura 2.** Regiões geográficas com casos de doença de Chagas aguda transmitida por via oral. Fonte: Adaptado de Bruneto et al., 2021. 18
- Figura 3.** O ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasito tem um ciclo de vida dixênico, infectando insetos da família Reduviidae e mamíferos. Após a alimentação sanguínea (1), no intestino médio anterior (IMA) do inseto, as formas pleomórficas sobreviventes do *T. cruzi* se diferenciam em formas semelhantes a amastigotas nas primeiras horas de infecção do IMA (2). Essas formas, então, migram para o intestino médio posterior (IMP), onde ocorre a epimastigogênese primária (P-rdEpi), dando origem primeiro a epimastigotas infecciosos replicantes e, posteriormente, a epimastigotas que colonizam o IMP (3). Esses últimos migram para o intestino grosso, onde ocorre a metaciclogênese e, dependendo do estado do meio nutricional, as tripomastigotas metacíclicas (MTs) também se diferenciam em epimastigotas infectivas em um processo chamado epimastigogênese secundária (S-rdEpi) (4). As formas MTs (De Souza; Barrias, 2020), epimastigotas infectivas (Kessler et al., 2017) e epimastigotas são excretadas nas fezes (5). As formas resistentes ao complemento do hospedeiro e a outros componentes do sistema imunológico inato podem infectar várias células nucleadas do hospedeiro, inclusive macrófagos, células musculares, células epiteliais, fibroblastos e células nervosas. Tanto as MTs quanto as epimastigotas infectivas entram nas células hospedeiras por meio de mecanismos distintos, levando à formação do vacúolo parasitóforo (VP) (6). Depois de escapar do VP, as MTs se diferenciam em amastigotas, que se replicam no citosol da célula infectada (7) e podem passar pela forma rdEpi antes de completar sua transformação em tripomastigota sanguíneo (BT). As tripomastigotas e, em menor grau, as amastigotas rompem a célula hospedeira (8), entram na corrente sanguínea e, em seguida, obtêm acesso a outras células para iniciar um novo ciclo de divisão (9). O sinal (?) refere-se a etapas do ciclo celular que ainda precisam ser melhor estabelecidas. Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2023. 19
- Figura 4.** Estrutura química do nifurtimox e benznidazol. Fonte: Silva Júnior et al., 2014. 20
- Figura 5.** Lampit® (nifurtimox). Fonte: Bayer (<https://www.bayer.com/en/pharma/chagas-disease>). 21
- Figura 6.** Sistema de nomenclatura do local clivagem. Fonte: Adaptado de Schechter e Berger (1967). 23
- Figura 7.** Classificação de proteases através do tipo e posição da reação catalisada. As exopeptidases foram classificadas com base em seu modo de ação, enquanto as endopeptidases são classificadas com base no grupo de aminoácidos presente no sítio ativo. Fonte: Adaptado de Matkwala et al., 2021. 24
- Figura 8.** Resíduos do motivo catalítico conservados entre a família de zincinas. Fonte: Lenart et al., 2013. 27
- Figura 9.** Estrutura da TOP humana. A) As α -hélices individuais e as folhas- β estão numeradas, e a região estruturalmente semelhante a outras metalopeptidases de zinco está destacada em dourado. O zinco do local ativo é mostrado como uma esfera azul. B) Representação da superfície da thimet oligopeptidase demonstrando um modelo de ligação usando a neurotensina como substrato. Fonte: Adaptado de Ray et al., 2004. 28
- Figura 10.** Influência da temperatura na atividade da rTOPTc. O tampão fosfato (pH 7) foi utilizado para testar a eficiência catalítica da enzima nas temperaturas de 20 a 80 °C. Fonte: Cardoso, 2022. 32

- Figura 11.** A) IC₅₀ do inibidor de metaloproteases fenantrolina; B) IC₅₀ do inibidor de TOP Cpp-Ala-Ala-Phe-Abz.. Fonte: Cardoso, 2022. 33
- Figura 12.** Representação ilustrativa da metodologia utilizada no trabalho. Fonte: Imagem/ilustração criada com BioRender. 37
- Figura 13.** Estrutura química dos inibidores de TOP utilizados como *template* na seleção da biblioteca de compostos. 40
- Figura 14.** Resumo das etapas realizadas durante a triagem virtual baseada em *docking* molecular. . 41
- Figura 15.** Alinhamento das sequências de TOPTc (Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3) e Tc00.1047053511237.10 (Q4D7D2)). O motivo de ligação ao zinco característico está destacado em verde, o resíduo de glutamato (E503), importante para a interação com o íon metálico, está destacado em vermelho e os polimorfismos de cada uma das sequências estão destacados em magenta. 47
- Figura 16.** Modelos tridimensional da TOPTc preditos pelo servidor Alphafold. O modelo obtido através da sequência Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3) é representado pela cor ciano, enquanto o Tc00.1047053511237.10 (Q4D7D2) é representado pela cor laranja. 48
- Figura 17.** Polimorfismos presentes nas diferentes sequências da TOPTc representados no modelo tridimensional. Os 18 polimorfismos presentes nas sequências estão representados na cor magenta nas estruturas. As duas representações dos modelos de TOPTc (Q4CVA3 (ciano) e Q4D7D2 (laranja)) sobrepostos estão rotacionadas em 180° em torno do eixo y. 49
- Figura 18.** Visão geral do alinhamento das 28 sequências obtidas através do servidor BLASTp, no qual a thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (TOPTc (Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3))) serviu de entrada para a busca. O servidor ESPript 3.0 foi usado para gerar o alinhamento, a caixa azul indica as similaridades na sequência, resíduos idênticos são representados com caracteres brancos em fundo vermelho, resíduos conservados aparecem destacados em vermelho com fundo branco, resíduos não conservados são representados na cor preta e os asteriscos representam uma marcação que é feita a cada 10 resíduos de aminoácido. 52
- Figura 19.** Árvore filogenética. O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado usando o Clustal Omega e as análises evolutivas foram inferidas usando o método *Neighbor-Joining* conduzido no MEGA 11 (versão 11.0.13). O servidor Interactive Tree Of Life (iTOL) foi usado para visualização e edição da árvore filogenética. As sequências de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) de *Homo sapiens* e Oligopeptidase dependente de zinco de *Babesia massiliensis* foram usadas como grupos externos. 52
- Figura 20.** Confirmação da expressão da proteína recombinante. A) SDS-PAGE, corado com coomassie blue. B) Membrana corada com vermelho de ponceau. C) *Western blotting*. MW: marcador de massa molecular (Bio-rad *precision plus protein dual color*); OPB: oligopeptidase B (utilizada como controle); TOPTc: thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*. 53
- Figura 21.** A) Teste *in silico* de afinidade de diferentes íons metálicos aos resíduos H474, E475 e E503 da TOPTc utilizando o servidor MIB2 (<http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB2/>); B) Efeito dos íons metálicos na atividade da TOPTc: A atividade foi testada na presença de diferentes íons metálicos (concentração de 0,5 mM) e sem adição de metal (-); C) Influência do zinco na atividade da TOPTc, (+) enzima não tratada com EDTA e na presença de tampão com 5 µM de cloreto de zinco, (-) enzima tratada com EDTA (100 mM) e sem zinco adicionado ao tampão, (Zn) enzima tratada com EDTA (100 mM) e zinco (0,5 mM). ***p<0,0001. 55
- Figura 22.** Peróxido de hidrogênio promove a oxidação e modula a atividade da rTOPTc sem interferir no estado de oligomerização. A) Influência do peróxido de hidrogênio na atividade da enzima. Controle: enzima sem peróxido de hidrogênio. MW: marcador de massa molecular. C:

- controle. **** $p < 0,0001$; B) SDS PAGE, purificação da TOPTc expressa em *E. coli* BL21-AITM. 56
- Figura 23.** Curva de desnaturação térmica da rTOPTc obtida através da fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura. T_m: temperatura média; U.A.: unidades arbitrárias. No canto superior direito está o gráfico de influência da temperatura na atividade da rTOPTc (fonte: Cardoso, 2022). 57
- Figura 24.** Estabilidade da rTOPTc submetida a diferentes temperaturas, -80°C e temperatura ambiente, ao longo de 21 dias. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ 58
- Figura 25.** Curva de calibração para gel filtração. Os volumes de eluição das proteínas padrões são transformados em K_{av} para a coluna SuperdexTM 200 10/300 GL (volume vazio 7,54 ml, volume total 24 ml). Isso é plotado em relação à função logarítmica da massa molecular conhecida. 59
- Figura 26.** Cromatografia por exclusão de tamanho ou gel filtração feita utilizando a coluna SuperdexTM 200 10/300 GL. Em verde temos uma mescla dos gráficos das misturas de calibração compostas por ferritina, álcool desidrogenase, ovalbumina, conalbumina, anidrase carbônica e ribonuclease A e em vermelho pontilhado temos a purificação da enzima recombinante thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (TOPTc). 60
- Figura 27.** Matriz de especificidade na posição dos resíduos de diferentes substratos clivados pela thimet oligopeptidase. Fonte: MEROPS. 61
- Figura 28.** Clivagem de peptídeos hormonais pela TOPTc. Identificação dos peptídeos por espectrometria de massas. 63
- Figura 29.** O modelo tridimensional predito da TOPTc (Q4D7D2) foi sobreposto com a estrutura tridimensional da TOP humana que está disponível no PDB sob o código 2O36. Os resíduos do sítio catalítico que fazem interação com o átomo de zinco (TOPTc: H474, E475, H478 e E503; TOP humana: H473, E474, H477 e E502) foram destacados. 65
- Figura 30.** Poses e *docking scores* dos cinco melhores compostos da triagem *in vitro*. A) compostos que foram escolhidos com base na similaridade com o inibidor R2; B) com o inibidor Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAB; C) com o inibidor Cpp-Ala-Pro-Phe-pAB. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Entradas correspondentes ao gênero <i>Trypanosoma</i> que foram selecionados para compor a árvore filogenética.....	50
Tabela 2. Especificidade da clivagem dos peptídeos hormonais pela rTOPTc	62
Tabela 3. Análise da qualidade dos modelos preditos por diferentes servidores.....	64
Tabela 4. Compostos provenientes da triagem virtual que foram selecionados para os testes <i>in vitro</i>	66

RESUMO

SILVA, V.L.S. **Integração de estratégias computacionais e experimentais na caracterização da metaloprotease Thimet Oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi***. 2024. 91 páginas. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário que foi descoberto e descrito pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas e, até o momento, integra a lista de doenças tropicais negligenciadas (DTN) da Organização Mundial de Saúde. Essa doença afeta mais de 6 milhões de pessoas em todo o mundo, causando uma série de impactos socioeconômicos na vida dos afetados e também no sistema de saúde dos países endêmicos. O tratamento disponível é limitado a dois fármacos que são ineficazes para o estágio crônico da doença, além de causarem efeitos colaterais nos pacientes. As proteases desempenham funções cruciais no ciclo de vida do parasito e estão intrinsecamente envolvidas nos mecanismos moleculares de invasão e infecção da célula hospedeira. A Thimet Oligopeptidase (TOP) é uma metaloprotease que pertence à família M3 e tem um motivo de ligação ao zinco, composto pela sequência de aminoácidos HEXXH, que é altamente conservada nessa família. A enzima é secretada pelo protozoário em quantidades substanciais, sugerindo seu possível envolvimento no processo de infecção da célula hospedeira. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi associar metodologias experimentais e *in silico* a fim de dar continuidade à caracterização bioquímica e estrutural da protease thimet oligopeptidase de *T. cruzi* (TOPTc) além de triagem de potenciais inibidores dessa enzima. Os principais resultados obtidos foram a construção e validação de modelos tridimensionais que permitiu a comparação com estruturas já existentes, realização de triagem *in silico* que possibilitou a priorização de 13 moléculas para os ensaios de inibição *in vitro*, além disso, testes de afinidade a diferentes íons metálicos confirmaram a preferência do zinco em relação a outros cátions e a cromatografia de exclusão por tamanho revelou a presença majoritária da enzima recombinante como monômero. Dessa forma, este trabalho contribuiu para o conhecimento acerca de características bioquímicas e estruturais da TOPTc e o potencial desenvolvimento de moléculas inibidoras contra essa protease, que pode ser um importante alvo terapêutico para a doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Thimet oligopeptidase; *Trypanosoma cruzi*; metaloprotease; inibidor de protease; análises *in silico*; caracterização bioquímica e estrutural.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan that was discovered and described by the Brazilian researcher Carlos Chagas and, to date, is on the World Health Organization's list of neglected tropical diseases (NTD). This disease affects more than 6 million people worldwide, causing a series of socioeconomic impacts on the lives of those affected and also on the health system of endemic countries. The available treatment is limited to two drugs that are ineffective for the chronic stage of the disease, as well as causing side effects in patients. Proteases play crucial roles in the parasite's life cycle and are intrinsically involved in the molecular mechanisms of invasion and infection of the host cell. Thimet Oligopeptidase (TOP) is a metalloprotease that belongs to the M3 family and has a zinc-binding motif, composed of the amino acid sequence HEXXH, which is highly conserved in this family. The enzyme is secreted by the protozoan in substantial quantities, suggesting its possible involvement in the host cell infection process. In light of this, the aim of this work was to combine experimental and *in silico* methodologies in order to continue the biochemical and structural characterization of the thimet oligopeptidase protease from *T. cruzi* (TOPTc) and to screen for potential inhibitors of this enzyme. The main results obtained were the construction and validation of three-dimensional models which allowed comparison with existing structures, *in silico* screening that enabled the prioritization of 13 molecules for in vitro inhibition assays, in addition, affinity tests to different metal ions confirmed the preference of zinc over other cations and size exclusion chromatography revealed the presence of the recombinant enzyme as a majority monomer. In this way, this work has contributed to understanding the biochemical and structural characteristics of TOPTc and the potential development of inhibitor molecules against this protease, which could be an important therapeutic target for Chagas' disease.

Keywords: Chagas disease; Thimet oligopeptidase; *Trypanosoma cruzi*; metalloprotease; protease inhibitor; *in silico* analyses; biochemical and structural characterization.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

No início do século XX, o médico e sanitarista Carlos Chagas descobriu e descreveu a doença de Chagas (DC), também chamada de tripanossomíase americana. Esta doença, listada entre as doenças tropicais negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida. Essa ordem inclui outros parasitas de relevância médica e socioeconômica, como os protozoários do gênero *Leishmania*.

Segundo a OMS, cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* ao redor do mundo, levando a aproximadamente 12.000 mortes por ano (World Health Organization, 2024). A América Latina é responsável pela maioria dos casos, sendo endêmica em 21 países, entretanto, a globalização e as migrações fazem com que essa doença também esteja presente em países não endêmicos (Figura 1).

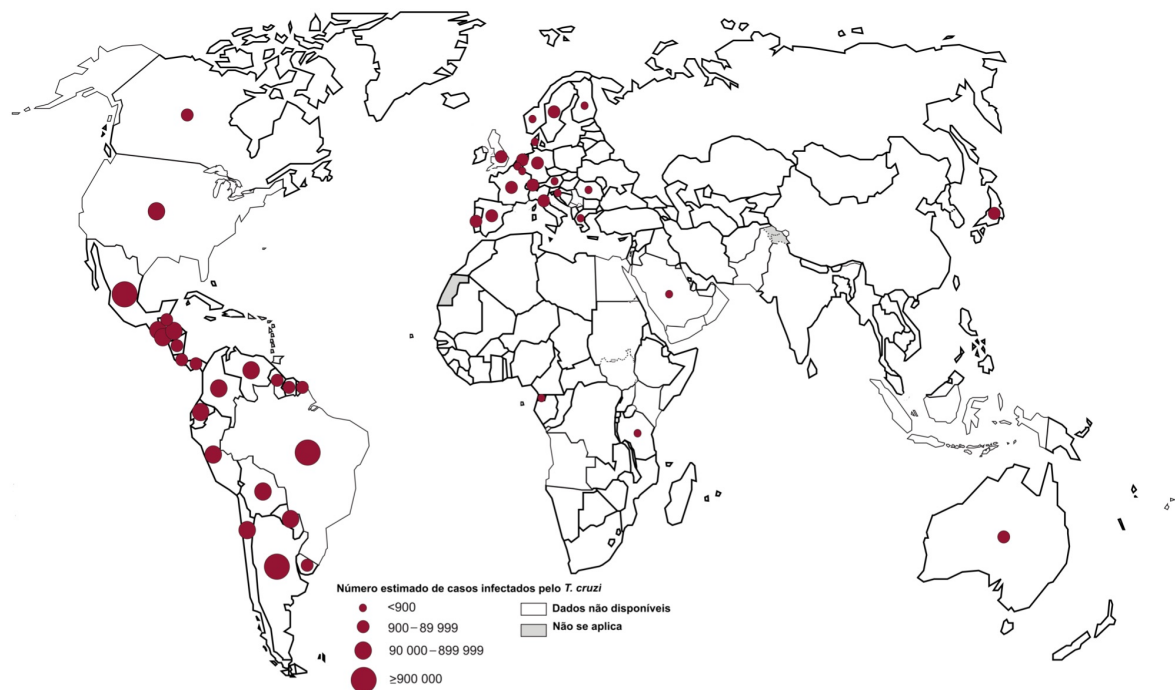


Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018. Fonte: Adaptado de World Health Organization, 2018.

Atualmente, aproximadamente 75 milhões de pessoas são consideradas em risco de infecção (World Health Organization, 2024). Na América Latina esta doença é comumente encontrada em áreas rurais e em comunidades marginalizadas estando intimamente associada a condições de habitação precárias, falta de saneamento básico e acesso limitado a serviços de

saúde (Avaria et al., 2022; Brasil, 2023). Além disso, a presença de moradias inadequadas, muitas vezes com materiais de construção precários e infestação por insetos vetores, como o triatomíneo, aumenta a exposição das pessoas ao parasita (Brasil, 2023). No entanto, os movimentos migratórios, seja em nível local, rural-urbano, regional ou global, foram responsáveis por expandir a distribuição geográfica da infecção para territórios onde ela não era conhecida anteriormente, transformando a doença de Chagas em uma doença emergente de crescente interesse biossanitário.

As doenças tropicais negligenciadas, como o próprio nome sugere, são doenças que atingem as populações mais pobres e marginalizadas, não apenas tirando sua saúde, mas também incapacitando-as e consequentemente afetando sua situação socioeconômica. Essas enfermidades têm pouca visibilidade quando comparadas com outras doenças como câncer e o fato de estarem quase ausentes da agenda global de saúde faz com que recebam pouco financiamento sendo associadas ao estigma e à exclusão social (Brasil, 2023).

A pandemia do COVID-19 agravou esse cenário no contexto brasileiro, visto que diversas doenças de notificação compulsória foram menosprezadas, especialmente durante o período de pico da pandemia e a consequência dessa ausência de notificação resultou em indivíduos mais vulneráveis a adquirirem a doença, podendo desenvolver desfechos clínicos graves (Souza et al., 2022).

A principal forma de transmissão na América Latina é vetorial, na qual o triatomíneo infectado com o *T. cruzi*, durante o repasto sanguíneo deposita suas fezes e/ou urina contaminadas que acabam entrando em contato com a pele lesionada ou mucosas do hospedeiro vertebrado (World Health Organization, 2024; Fiocruz, 2017). Existem ainda outras formas de transmissão menos frequentes, mas com importância médica como a congênita, transfusional, através de transplante de órgãos, oral ou até mesmo por acidentes de laboratório (World Health Organization, 2024).

Até 2004, a ocorrência da DC aguda por alimentos contaminados constituía um evento pouco investigado ou conhecido. Com o passar dos anos, tornou-se frequente na região amazônica relacionado ao consumo de açaí, que é um alimento essencial na dieta da população da região norte do Brasil. A ocorrência de outros surtos em diversos estados brasileiros também foi relatada (Figura 2), não somente ligado ao açaí, mas também ao consumo de outros alimentos, como o caldo de cana (Ferreira; Branquinho; Leite, 2014). Costa et al. (2017) afirmam que a transmissão por alimentos contaminados tem sido relatada como responsável por até 70% dos casos no Brasil, ocasionando na mudança do perfil epidemiológico da doença principalmente em surtos na Bacia Amazônica (Pérez-Molina; Molina, 2017). De acordo com

o Ministério da Saúde, o Brasil registra cerca de 280 novos casos na forma aguda por ano, com 80% destes por meio da ingestão de alimentos contaminados (Brasil, 2023).



Figura 2. Regiões geográficas com casos de doença de Chagas aguda transmitida por via oral. Fonte: Adaptado de Bruneto et al., 2021.

1.2 CICLO DE VIDA E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA

O protozoário causador da DC possui um ciclo de vida digenético complexo, envolvendo hospedeiro vertebrado e invertebrado, transitando por diversas formas incluindo epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo (Gonçalves et al., 2018; Jansen; Xavier; Roque, 2018). O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve os hospedeiros mamíferos e triatomíneos, possuindo diferentes formas que são divididos em replicativas ou infecciosas. A infecção do hospedeiro vertebrado começa com as tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto, que entram na ferida causada pela picada do triatomíneo ou através das membranas mucosas. Em seguida, esses parasitos entram de forma ativa nas células secretando diversas proteases, como cruzipaina, oligopeptidase B e prolil oligopeptidase, e se diferenciam em formas replicativas redondas chamadas amastigotas. Essas formas arredondadas se multiplicam por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas que são liberadas na corrente sanguínea podendo infectar novas células e tecidos. Uma vez que as tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo, elas se transformam em epimastigotas no intestino médio posterior do inseto, onde se replicam e

depois migram para o intestino grosso usando seus flagelos para se prender à cutícula serosa e posteriormente se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (Figura 3) (Ferreira et al., 2023).

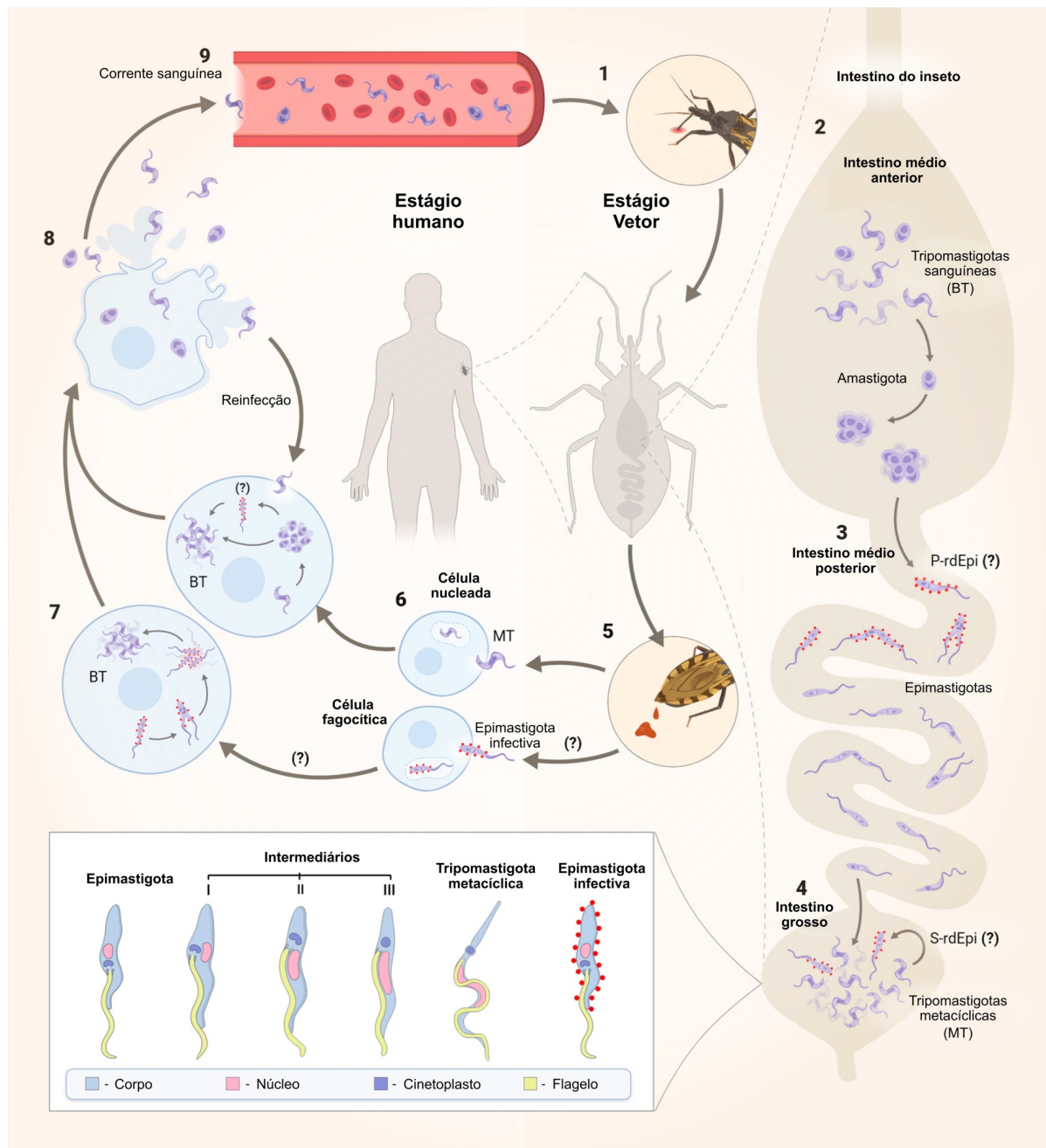


Figura 3. O ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasito tem um ciclo de vida dixênico, infectando insetos da família Reduviidae e mamíferos. Após a alimentação sanguínea (1), no intestino médio anterior (IMA) do inseto, as formas pleomórficas sobreviventes do *T. cruzi* se diferenciam em formas semelhantes a amastigotas nas primeiras horas de infecção do IMA (2). Essas formas, então, migram para o intestino médio posterior (IMP), onde ocorre a epimastigogênese primária (P-rdEpi), dando origem primeiro a epimastigotas infecciosos replicantes e, posteriormente, a epimastigotas que colonizam o IMP (3). Esses últimos migram para o intestino grosso, onde ocorre a metaciclogênese e, dependendo do estado do meio nutricional, as tripomastigotas metacíclicas (MTs) também se diferenciam em epimastigotas infectivas em um processo chamado epimastigogênese secundária (S-rdEpi) (4). As formas MTs (De Souza; Barrias, 2020), epimastigotas infectivas (Kessler et al., 2017) e epimastigotas são excretadas nas fezes (5). As formas resistentes ao complemento do hospedeiro e a outros componentes do sistema imunológico inato podem infectar várias células nucleadas do hospedeiro, inclusive

macrófagos, células musculares, células epiteliais, fibroblastos e células nervosas. Tanto as MTs quanto as epimastigotas infectivas entram nas células hospedeiras por meio de mecanismos distintos, levando à formação do vacúolo parasitóforo (VP) (6). Depois de escapar do VP, as MTs se diferenciam em amastigotas, que se replicam no citosol da célula infectada (7) e podem passar pela forma rdEpi antes de completar sua transformação em tripomastigota sanguíneo (BT). As tripomastigotas e, em menor grau, as amastigotas rompem a célula hospedeira (8), entram na corrente sanguínea e, em seguida, obtêm acesso a outras células para iniciar um novo ciclo de divisão (9). O sinal (?) refere-se a etapas do ciclo celular que ainda precisam ser melhor estabelecidas. Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2023.

A doença é frequentemente diagnosticada de forma tardia e pode apresentar dois estágios clínicos definidos: agudo e crônico. A fase aguda da doença é geralmente assintomática ou com sintomas inespecíficos como febre, dor de cabeça, vômito e náuseas. A fase crônica é dividida em dois tipos, indeterminada e sintomática. Quando assintomática, o paciente costuma permanecer nesse estado por décadas ou pelo resto da vida (Bern, 2015). Porém, cerca de 30% dos pacientes infectados progridem para a fase sintomática desenvolvendo manifestações cardíacas (Simões et al., 2018), os outros tipos consistem em gastrointestinais ou mistas. Conforme a revisão de Medina-Rincón et al. (2021), manifestações gastrointestinais temporárias também podem ser observadas na fase aguda.

1.3 TRATAMENTO

O tratamento da DC é restrito a dois fármacos, benznidazol (Rochagan® ou Radanil®) e nifurtimox (Lampit®) (Figura 4).

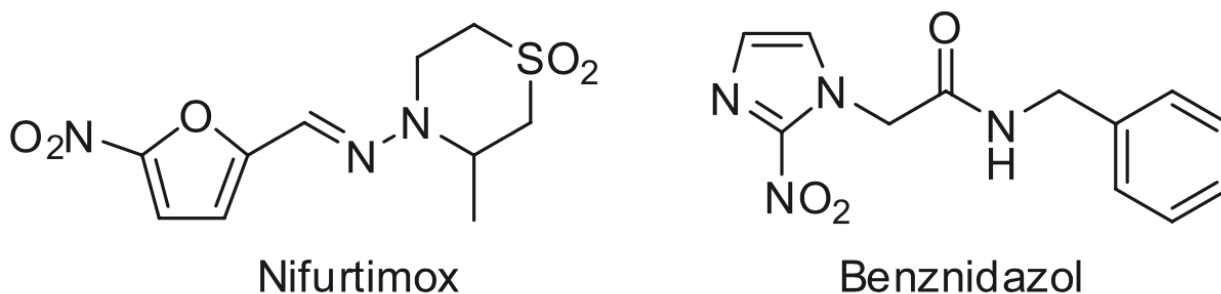


Figura 4. Estrutura química do nifurtimox e benznidazol. Fonte: Silva Júnior et al., 2014.

Embora com resultados variáveis entre os indivíduos tratados, o benznidazol geralmente apresenta eficácia na fase aguda, porém, uma baixa atividade antiparasitária na fase crônica da DC (Cunha et al., 2011). Além disso, devido à alta toxicidade e efeitos colaterais severos, uma parcela dos pacientes abandonam o tratamento antes de sua finalização (Torrico et al., 2021).

Em agosto de 2020 a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos anunciou a aprovação do Lampit® (nifurtimox) (Figura 5) para uso em pacientes pediátricos, o medicamento pode ser usado desde o nascimento até a idade de 18 anos, desde que o indivíduo tenha pelo menos 2,5 kg. Entretanto, até janeiro de 2021 esse medicamento só estava disponível nos Estados Unidos através do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).



Figura 5. Lampit® (nifurtimox). Fonte: Bayer (<https://www.bayer.com/en/pharma/chagas-disease>).

Esse cenário evidencia a necessidade do desenvolvimento de novas terapêuticas e abordagens para o tratamento da doença de Chagas que possam ser mais eficazes em ambas as fases da doença, de baixo custo, com menos efeitos adversos e de administração fácil e segura para o paciente, de forma a evitar que o tratamento seja descontinuado.

Desempenhando funções importantes na fisiologia dos micro-organismos e na patologia causada por eles, as proteases constituem uma estratégia interessante para a produção de potentes agentes antimicrobianos através da sua inibição por inibidores específicos que poderão ser utilizados pela Ciência no desenvolvimento de novos alvos para medicamentos e vacinas (Instituto Oswaldo Cruz, 2013; Coombs; Mottran, 1997). Um dos casos de grande sucesso foi o desenvolvimento de inibidores baseados na estrutura de uma protease de HIV, que são eficientes inibidores da replicação viral (Nishi et al., 2007) e têm sido utilizados clinicamente como medicamentos contra AIDS (Bierman et al., 2009; Carr; Amin, 2009). Um exemplo de

medicamento mais recente desenvolvido em um curto intervalo de tempo com o auxílio de novas tecnologias como a modelagem computacional é o Paxlovid, que é um peptídeomimético desenvolvido pela Pfizer sendo composto por dois princípios ativos, o ritonavir e o nirmatrelvir, inibindo a protease 3CLpro e consequentemente impedindo a replicação viral do SARS-CoV-2 (Carvalho; Lima; Mesquita, 2023).

1.4 PROTEASES

As proteases são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, liberando fragmentos de tamanhos variáveis como peptídeos ou até mesmo aminoácidos livres (López-Otín; Overall, 2002). São de extrema importância, visto que atuam em diferentes processos metabólicos de diversos organismos (Rawlings; Barret; Bateman, 2012). Ademais, também possuem aplicação comercial, estando entre os maiores grupos de enzimas industriais, responsáveis por mais da metade da venda internacional de enzimas (Muri, 2014). As enzimas proteolíticas são tidas como fatores significantes na virulência do *T. cruzi* (Grellier et al., 2001; Moura, 2011, Bastos et al., 2013, Alvarez et al., 2021) e a sua participação nos mecanismos de sobrevivência de parasitos é algo amplamente discutido.

Sistemas de nomenclatura e classificação de organismos e objetos tem grande importância para a sociedade, permitindo com que as pessoas possam se comunicar de forma mais eficiente garantindo que estejam falando da mesma coisa, evitando ruídos na comunicação. As proteases possuem uma especificidade pelo substrato e este modo de ligação é representado pelo sistema descrito por Schechter e Berger (1967). Nesse sistema, o local de clivagem no substrato pelo peptídeo está entre os resíduos de aminoácidos designados P1 e P1', sendo essa ligação denominada de cindível ou hidrolisável (Muri, 2014).

A nomeação dos resíduos de aminoácidos do substrato ocorre do N-terminal para o C-terminal, como: P_n...P₄, P₃, P₂, P₁, P₁', P₂', P₃', P₄'...P_n'. A nomeação dos correspondentes sítios de ligação na enzima também segue a mesma lógica do substrato, todavia, usando a letra S nesse caso (Figura 6).

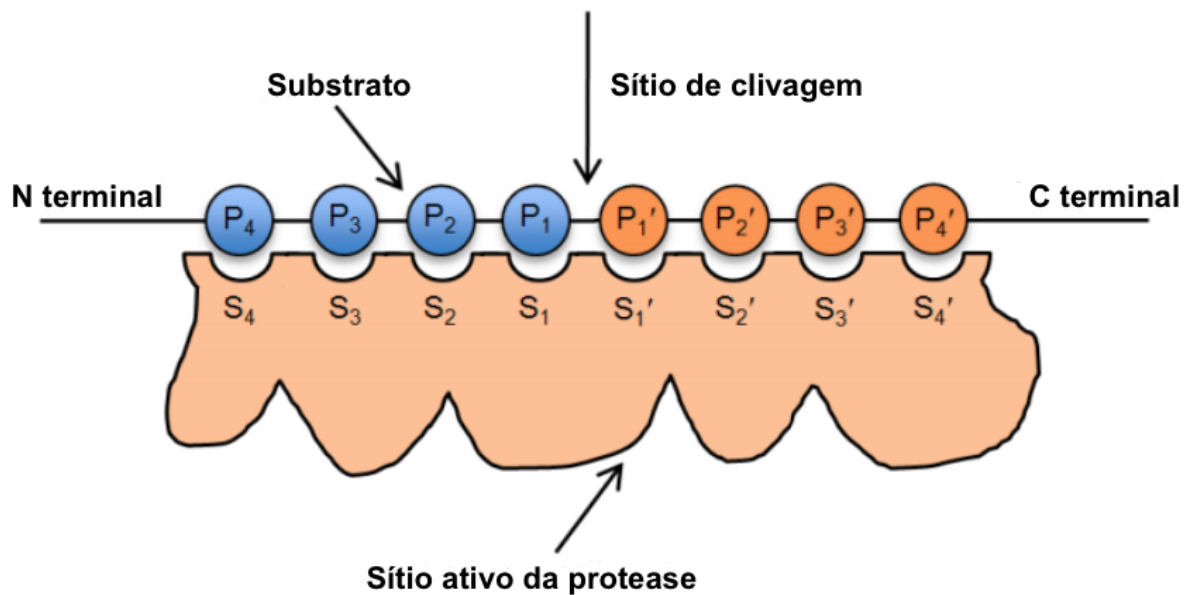


Figura 6. Sistema de nomenclatura do local clivagem. Fonte: Adaptado de Schechter e Berger (1967).

De acordo com a base de dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>), existem três formas de classificação de proteases que estão em uso: 1) classificação através do mecanismo químico de catálise; 2) classificação através do tipo e posição da reação catalisada; 3) classificação através da estrutura molecular e homologia.

1.4.1 Classificação através do mecanismo químico de catálise

Nessa forma de classificação, as proteínas são divididas em nove grupos (Figura 7), descritos como aspártico (A), cisteína (C), glutâmico (G), metalo (M), asparagina (N), misto (P), serina (S), treonina (T) e desconhecido (U) (MEROPS, 2017; Muri, 2014), nos quais sete deles são bem definidos (A, C, G, M, N, S, T), um é misto (P) e um é indefinido (U) (Hartley, 1960).

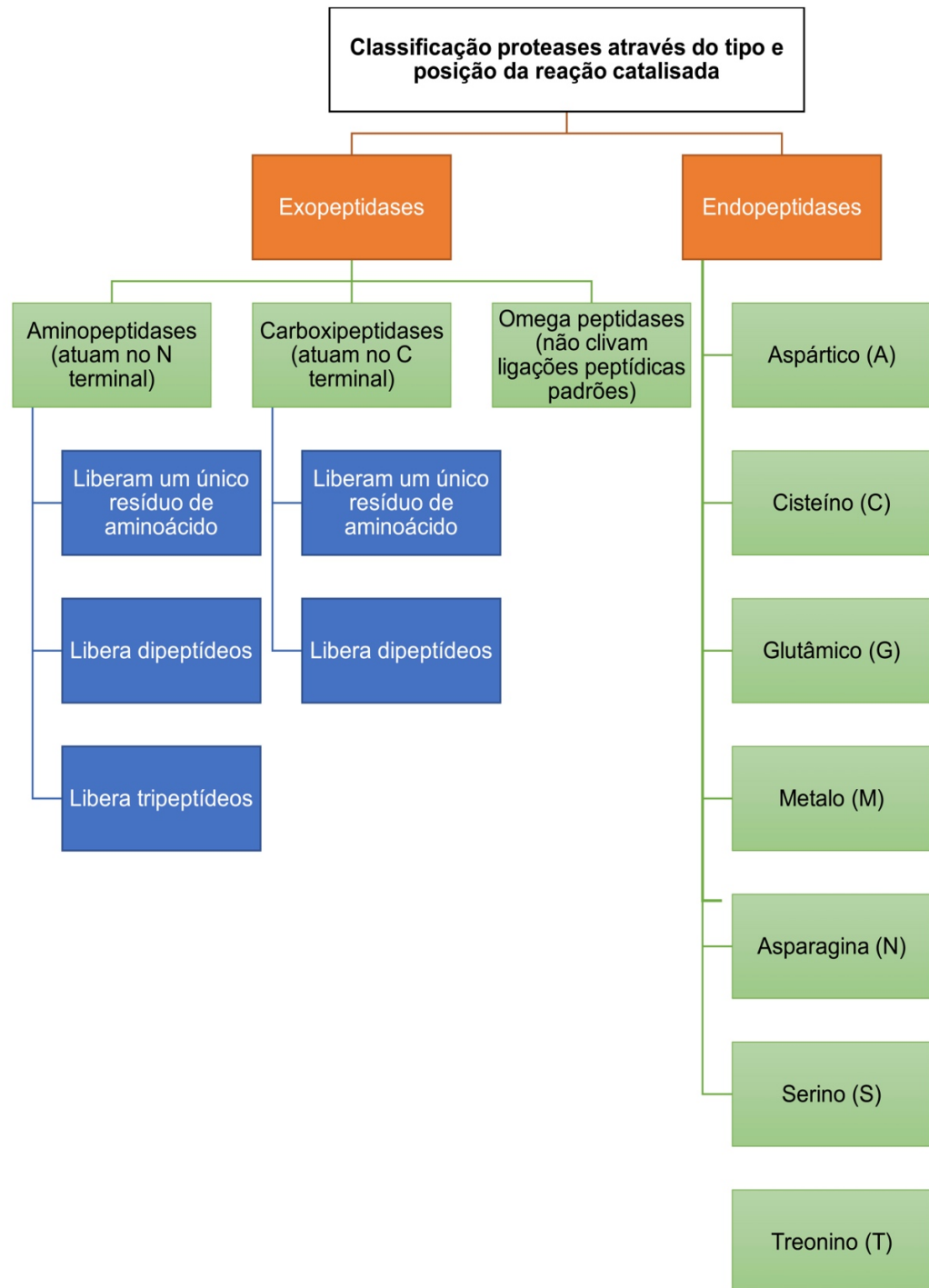


Figura 7. Classificação de proteases através do tipo e posição da reação catalisada. As exopeptidases foram classificadas com base em seu modo de ação, enquanto as endopeptidases são classificadas com base no grupo de aminoácidos presente no sítio ativo. Fonte: Adaptado de Matkwala et al., 2021.

Essa forma de classificação apresenta algumas vantagens tais como, por exemplo, toda cisteíno protease apresenta um resíduo de cisteína agindo como nucleófilo no sítio catalítico, porém, também apresenta desvantagens como o fato de incluir moléculas com estruturas muito

distintas entre elas, apresentando pouca ou nenhuma homologia fazendo com que o grupo tenha pouco significado por si próprio.

1.4.2 Classificação através do tipo e posição da reação catalisada

As proteases possuem seletividade em relação a quais ligações serão hidrolisadas, ou seja, em qual posição específica da cadeia polipeptídica irão atuar. De acordo com o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), elas são classificadas em: exopeptidases e endopeptidases (Matkwala et al., 2021).

As exopeptidases clivam somente nas regiões amino (N-terminal) ou carboxi-terminais (C-terminal) das cadeias polipeptídicas, enquanto as endopeptidases atuam nas regiões internas entre a região N e C-terminal. Cada uma dessas pode ser subdividida, no caso das exopeptidases essa divisão ocorre de acordo com o número de resíduos liberados, já as endopeptidases pelo tipo de resíduo de aminoácido que está presente no sítio ativo (Figura 7). Quando uma peptidase cliva um único resíduo na região N-terminal são denominadas aminopeptidases, dois ou três resíduos são designadas de dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases, respectivamente. Enzimas que clivam na região C-terminal, liberando um único aminoácido são denominadas carboxipeptidases, caso seja um dipeptídeo são classificadas como peptidil-dipeptidases. Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases) e existem ainda as omega peptidases que clivam ligações isopeptídicas (Barrett et al., 2004). As endopeptidases tem sua classificação de acordo com o mecanismo químico de catálise como foi citado anteriormente.

1.4.3 Classificação através da estrutura molecular e homologia

O terceiro tipo de classificação é o mais recente dos três, sendo baseado na estrutura molecular e homologia das proteases. Nesse sistema as peptidases são classificadas hierarquicamente em espécies, famílias e clãs, no qual cada um desses níveis possui um identificador (Rawlings et al., 2018). Apesar de ser o mais promissor em termos de agrupamento de informações relevantes, é o que apresenta a maior barreira em seu desenvolvimento, visto que depende da disponibilidade de dados de sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais em quantidades e qualidade relevantes, coisas que só foram obtidas a partir do início da década de 1990 (Rawlings; Barrett, 1993; Rawlings; Tolle; Barrett, 2004).

As famílias são construídas de acordo com a comparação na sequência de aminoácidos, cada um dos membros da família deve apresentar uma relação estatisticamente relevante com

pelo menos um dos membros da família. A identificação das famílias também segue o modelo de classificação através do mecanismo químico de catálise, usando apenas uma letra para designar cada um dos tipos de reação (A, C, G, M, N, S, T, P ou U) seguida de um número arbitrário (Rawlings et al., 2018).

Os clãs foram criados para designar conjuntos de famílias nos quais as proteínas divergiram de um ancestral comum de forma que sua relação não pode mais ser comprovada pela comparação das estruturas primárias. O agrupamento dos clãs é feito de acordo com a semelhança nas estruturas tridimensionais, com a disposição dos resíduos do sítio catalítico e em semelhanças na sequência de aminoácidos ao redor desse sítio. Assim como no caso das famílias, os clãs também possuem um identificador, sendo este composto de duas letras, a primeira se refere ao tipo catalítico e a segunda é atribuída sequencialmente à medida que os clãs são identificados (Rawlings et al., 2018).

Cada protease possui um identificador exclusivo armazenado no banco de dados de enzimas MEROPS, que é uma mistura da família, clã e alguns números que permitem diferenciar uma peptidase de outra (Rawlings et al., 2018). Composto o clã mais diversos de proteases, até o momento, as metaloproteases possuem mais de 50 famílias, sendo algumas envolvidas em processos biológicos conhecidos, que podem variar desde morfogênese até à imunidade de artrópodes parasitas (Fernando; Fischer, 2020). Contudo, muitas metaloproteases apesar de apresentarem influência na relação parasito-hospedeiro de doenças tropicais negligenciadas, por exemplo, ainda não possuem um entendimento de suas funções muito bem elucidado (Hambrook et al., 2018).

1.5 METALOPROTEASES

As metaloproteases, metaloproteinases ou metalopeptidases são enzimas dependentes de metal para o funcionamento do seu sítio catalítico. O íon metálico mais comum que as metaloproteases utilizam é o íon zinco (Zn^{2+}) (Häse; Finkelstein, 1993), outros metais também foram encontrados no sítio ativo como Co^{2+} e Mn^{2+} . Quase todas as metaloproteases de ocorrência natural são enzimas que possuem apenas um íon de zinco (Fukasawa et al., 2011). Em geral, os íons metálicos são ligados em uma conformação quase tetraédrica no local ativo. Três ligantes de aminoácidos, geralmente resíduos carregados, associam-se ao núcleo metálico juntamente com uma molécula de água que é usada para hidrólise (Vallee; Auld, 1990). Esta molécula de água complexada ao zinco serve como um nucleófilo para atacar o grupo carbonila da ligação peptídica alvo (Lew, 2004; Coates, 2003).

De acordo com suas similaridades estruturais, as metalopeptidases dependentes de zinco são classificadas em quatro grupos distintos (Hooper, 1994): 1) Zincinas: contém a sequência conservada HEXXH, como motivo de ligação ao zinco (Figura 8); 2) Inverzincinas: possuem o domínio Zincina invertido (HXXEH) de ligação ao zinco; 3) Carboxipeptidase: possui o motivo de ligação ao zinco, HXXE; e 4) DD-carboxipeptidase: apresenta o motivo de ligação ao zinco HXH.



Figura 8. Resíduos do motivo catalítico conservados entre a família de zincinas. Fonte: Lenart et al., 2013.

Para ligação ao metal, todos os grupos possuem como 1º e 2º ligantes resíduos de histidina, exceto as carboxipeptidases. Já o terceiro ligante pode ser um resíduo de histidina ou um ácido glutâmico (Souza, 2011). O maior grupo é representado pelas Zincinas, subdivididas em Gluzincinas, aquelas em que o terceiro ligante do zinco é o ácido glutâmico, e Metzincinas, cujo terceiro ligante do zinco é uma histidina. O grupo das gluzincinas é composto pelas famílias das termolisina, endopeptidase 24.11, aminopeptidase, enzima conversora angiotensina, endopeptidase 24.15 e neurotoxinas do tétano e do botulismo (Souza, 2011).

1.6 THIMET OLIGOPEPTIDASE

A thimet oligopeptidase (TOP), objeto de estudo desta dissertação, é uma metaloprotease membro da família M3, de acordo com o sistema MEROPS (Rawlings et al., 2014), juntamente com outras proteínas como neurolisina e sacarolisina. É uma protease bem estudada dentro da família que foi identificada pela primeira vez em uma fração solúvel de

cérebro de rato (Orlowski; Michaud; Chu, 1983) possuindo atividade catalítica máxima observada em pH de aproximadamente 7,8 (Barrett et al., 1995).

Outros nomes já foram atribuídos a ela, como endopeptidase 24.15, pz-peptidase e endo-oligopeptidase A, ainda há debate sobre a relação da TOP com a endo-oligopeptidase A (Camargo, 1991; Hayashi et al., 2010), apesar disso, em 1992 foi recomendado oficialmente pela IUBMB um único nome que pudesse designar todas essas nomenclaturas anteriores e fazer referência ao conjunto de características dessa protease (Barret; Chen, 2013).

Um dos seus atributos mais marcantes é a sua sensibilidade ao grupamento tiol (Icimoto et al., 2017), qualidade essa que isso serviu como uma espécie de acrônimo para o seu nome atual, Thimet oligopeptidase, ou seja, metaloprotease tiol sensível. Já o termo oligopeptidase é relacionado à restrição de tamanho dos substratos que são clivados pela enzima (Barret; Chen, 2013).

Possui uma estrutura composta por dois domínios que juntos possuem 24 α -hélices e 9 folhas- β (Figura 9A) formando uma estrutura que se assemelha a um canal estreito (Figura 9B), onde na sua base está localizado o seu sítio ativo (Ray et al., 2004).

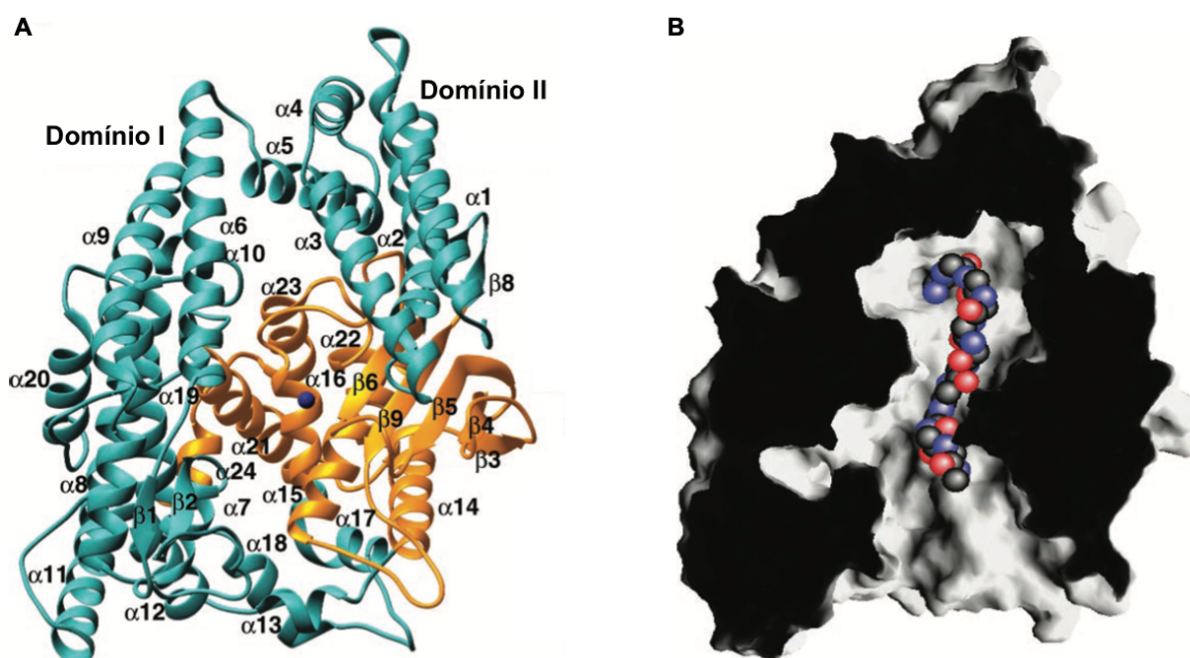


Figura 9. Estrutura da TOP humana. A) As α -hélices individuais e as folhas- β estão numeradas, e a região estruturalmente semelhante a outras metaloproteases de zinco está destacada em dourado. O zinco do local ativo é mostrado como uma esfera azul. B) Representação da superfície da thimet oligopeptidase demonstrando um modelo de ligação usando a neurotensina como substrato. Fonte: Adaptado de Ray et al., 2004.

Essa restrição relacionada à localização do sítio ativo permite que a enzima clive peptídeos contendo de 5 a 22 resíduos de aminoácidos (Montiel et al., 1997; Oliveira et al.,

2001; Berti et al., 2009), todavia, os tamanhos ideais de peptídeos são aqueles contendo de 9 a 12 resíduos de aminoácidos (Ferro; Gewehr; Navon, 2020).

A TOP é bastante estudada em humanos e alterações na sua expressão em células específicas podem estar relacionados com a doença de Alzheimer, no qual estudos proteômicos com o objetivo de identificar proteínas associadas à toxicidade mediada pela beta-amilóide em neurônios corticais primários demonstraram que a sua superexpressão foi neuroprotetora contra a toxicidade beta-amilóide (Koike et al. 1999; Pollio et al., 2008), e diferentes tipos de câncer como carcinoma hepatocelular (Nomoto et al., 2014) e câncer de pulmão (Qi et al., 2014). A expressão da TOP foi significativamente aumentada no tecido cerebral humano com doença de Alzheimer, quando comparada com os controles (Hok et al., 2022). Já a sua baixa expressão é relacionada com um melhor prognóstico de sobrevida de pacientes diagnosticados com câncer de pulmão (Liu; Zhao, 2019). A baixa expressão gênica no fígado também foi sugerida como um indicador de risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Liu; Zhao, 2019).

Há conhecimento prévio de que a TOP cliva em locais específicos, *in vitro* ou *in vivo*, hidrolisando muitos peptídeos bioativos do sistema nervoso central (SNC) e de outros tecidos, como neurotensina (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg↓Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu), bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe↓Ser-Pro-Phe-Arg), hormônio liberador de gonadotrofina (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr↓Gly-Leu-Arg-Pro-Gly), dinorfina A (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu↓Arg-Arg-Ile) e β -neoenorfina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu↓Arg-Lys-Tyr-Pro) (Orlowski et al., 1989; Serizawa; Dando; Barrett, 1995; Lew et al., 2004) (a clivagem é indicada pela seta para baixo (↓)). Oliveira et al. (2001) empregaram uma abordagem com substratos fluorescentes semelhante à de Lew et al. (2000), na qual usaram análogos da bradicinina com substituições de beta-aminoácidos para investigar diferenças na especificidade do substrato entre a TOP e a neurolisina.

As regras que determinam a especificidade do substrato da TOP ainda permanecem indefinidas, no entanto, tanto com inibidores quanto com substratos, os resíduos hidrofóbicos (diferentes de Ile) tendem a ser favorecidos nas posições P1 e P3', e o resíduo Pro em P2' (Orlowski; Michaud; Molineaux, 1988; Dando; Brown; Barrett, 1993). Uma preferência por clivar ligações de três a seis resíduos do C-terminal (Knight; Barrett, 1991; Knight; Dando; Barrett, 1995), também é observada para esta enzima. O íon metálico no caso dessa enzima é o zinco, além disso, possui um motivo de ligação altamente conservado, HEXXH, que também é observado em outras metaloproteases.

Ela é inibida por agentes quelantes, como a 1,10-fenantrolina, mas não é facilmente inibida pelo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o que revela um caráter controverso se tratando de uma metalopeptidase (Orlowski; Michaud; Chu, 1983; Barrett; Chen, 2013). Inibidores potentes com valores nanomolares de K_i foram desenvolvidos ao longo dos anos, dentre eles temos: Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb, Cpp-Ala-Pro-Tyr-pAb e Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb (Orlowski; Michaud; Molineaux, 1988; Knight; Barrett, 1991).

Porém, o Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb e o Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb não são adequados para uso em experimentos *in vivo* porque são instáveis. O Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb é clivado entre os resíduos alanina e fenilalanina (Ala↓Phe) e o Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb entre alanina e tirosina (Ala↓Tyr), ambos pela neprilisina, gerando potentes inibidores da peptidil-dipeptidase A e da enzima conversora de angiotensina 1 (ACE1), respectivamente, limitando o seu uso em estudos *in vivo* (Cardozo; Orlowski, 1993).

Além da clivagem de peptídeos bioativos do SNC, a TOP também cliva vários peptídeos pós-proteassomais (Saric; Graef; Goldberg, 2004), resultantes da atividade proteolítica contra autoantígenos, bem como em antígenos patogênicos. Logo, a inibição da TOP favorece a apresentação na superfície celular do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), em um mecanismo que foi descrito como dependente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Glickman; Ciechanover, 2002; York et al., 2003; Rock; York; Goldberg, 2004).

A regulação da atividade da TOP ocorre em nível de expressão e por modificação pós-traducional (Portaro et al., 2001; Lesley; Adrian, 2003). Outro mecanismo postulado como contribuindo para a regulação da TOP é a multimerização pela formação de ligações dissulfeto intermoleculares. Foi descrito que a multimerização da TOP ocorre *in vitro*, na ausência de agente redutor (Shrimpton et al., 1997; Ray; Hines; Rodgers, 2002), e também em ensaios celulares devido à glutationilação da Cys246 e da Cys175 (Demasi et al., 2008; Malvezzi et al., 2012).

Essa variedade de funções da enzima é resultado de sua ampla distribuição celular, que foi isolada como uma forma secretada e citosólica, como uma forma solúvel e associada à membrana e de vários compartimentos subcelulares (Shrimpton; Smith; Lew, 2002), e de sua capacidade de clivar vários peptídeos sem especificidade significativa de local ou subsítio de clivagem (Sigman et al., 2005). Com base na importância da multiplicidade de funções e no grande número de possíveis substratos da TOP, é relevante entender o mecanismo estrutural pelo qual ela pode acomodar seus vários substratos.

Proteínas secretadas são mediadores fundamentais na comunicação parasito-hospedeiro participando em diferentes processos (Silverman et al., 2008), uma das moléculas secretadas por *T. cruzi* e *Leishmania braziliensis* é a thimet oligopeptidase (Queiroz, 2013; Queiroz et al., 2014; Machado, 2013). Maçaneiro (2008) sugere que a formação do imunoproteassoma é inibida em células infectadas pelo *T. cruzi* com posterior tratamento com IFN- γ , por um mecanismo de regulação traducional das subunidades induzidas.

Além disso, há uma interação entre o parasito e as regiões não traduzidas da subunidade β 1i do imunoproteassoma humano e esta interação faz uma regulação negativa na expressão da subunidade (Name, 2022). Ainda não se sabe quais biomoléculas do parasito estão envolvidas nesta supressão, seu mecanismo de ação, se elas atuam de forma direta sobre esses RNAs mensageiros ou induzem a célula a fazer sua captura e se este mecanismo atua nas demais subunidades do imunoproteassoma e da via MHC I (Name, 2022).

1.6.1 Thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*

Estudos proteômicos revelam a presença dessa proteína principalmente na superfície de amastigotas (Queiroz, 2013). Estes estudos também incluem a TOP na lista de proteínas de expressão regulada durante a amastigogênese do *T. cruzi*, o que nos sugere que de alguma forma a TOPTc pode estar envolvida na transdução de sinal e regulação de processos biológicos nessa etapa do ciclo de vida do parasito (Queiroz, 2013; Queiroz et al., 2014).

O primeiro estudo focado na TOP de *T. cruzi* (Cardoso, 2022) revelou vários aspectos bioquímicos e estruturais dessa protease, como as condições ótimas de atividade da enzima, aspectos estruturais e imunocitocalização. A enzima possui 686 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de aproximadamente 78 kDa. A thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* recombinante (rTOPTc) foi expressa de forma solúvel e ativa em *E. coli* BL21-AI, sob indução a 20 °C durante 16 h com 0,5 mM de IPTG e 0,2% de L-arabinose. A purificação foi realizada por meio de cromatografia de afinidade usando uma resina com níquel, obtendo uma concentração de proteína pura que variou de 0,03 a 0,04 mg/mL.

No que tange às características catalíticas, a rTOPTc apresenta atividade ótima entre pHs 6 e 7 em tampão fosfato de sódio na concentração de 50 mM. A atividade enzimática da TOPTc permaneceu estável entre as temperaturas de 25 °C a 50 °C, apresentando uma queda brusca na atividade próximo aos 60 °C e se manteve sem atividade para as temperaturas de 70 °C e 80 °C (Figura 10). Embora resistente a temperaturas acima das mesófilas, a TOPTc mostrou-se sensível ao congelamento mesmo na presença de crioprotetor como o glicerol. Foi

observado que a temperatura de 4 °C foi definida como a ideal para armazenar a enzima purificada, visto que a enzima manteve aproximadamente 70% de sua atividade inicial mesmo após 21 dias (Cardoso, 2022). No entanto, outras condições ainda precisam ser testadas.

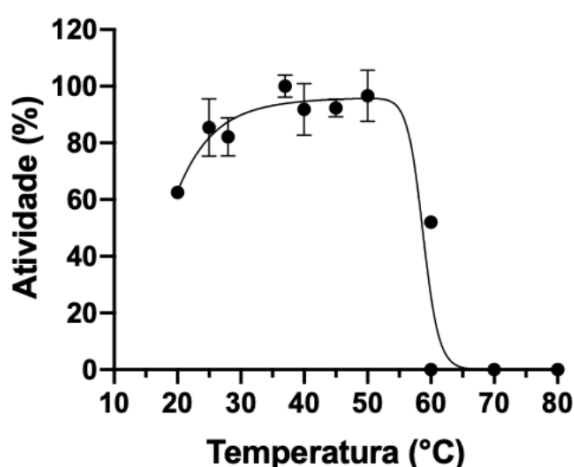


Figura 10. Influência da temperatura na atividade da rTOPTc. O tampão fosfato (pH 7) foi utilizado para testar a eficiência catalítica da enzima nas temperaturas de 20 a 80 °C. Fonte: Cardoso, 2022.

Em termos da influência de aditivos, observou-se que a enzima é sensível ao aumento da força iônica proporcionada pelo NaCl, em concentrações acima de 75 mM, havendo redução significativa da atividade. Por outro lado, a albumina sérica bovina (BSA) quando adicionada ao tampão de atividade pode levar a um aumento de mais de 100% na atividade da rTOPTc. Foi demonstrado ainda que a adição de cloreto de zinco (ZnCl_2) ao tampão fosfato aumentou a atividade da enzima recombinante, porém, outros íons metálicos precisam ser testados para confirmar a sua especificidade (Cardoso, 2022).

Embora agentes quelantes predominantemente inibam a atividade de metaloproteases, observou-se que EDTA nas concentrações de 1 mM e 10 mM, foi incapaz de inibir a enzima recombinante. No entanto, o inibidor fenantrolina, que também é um quelante, foi eficiente na inibição da atividade da rTOPTc com uma IC_{50} de 0,372 mM. Um inibidor sintético específico de TOPs, Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb também foi testado, sendo capaz de inibir a rTOPTc de forma ainda mais acentuada com um IC_{50} de 54,29 nM (Figura 11) (Cardoso, 2022).

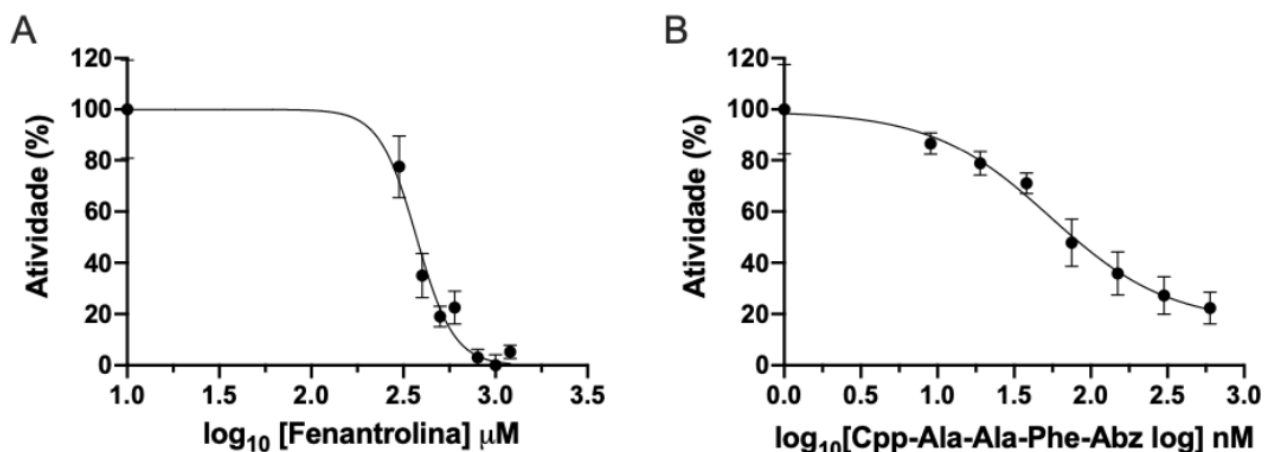


Figura 11. A) IC₅₀ do inibidor de metaloproteases fenantroline; B) IC₅₀ do inibidor de TOP Cpp-Ala-Ala-Phe-Abz.. Fonte: Cardoso, 2022.

Anticorpos específicos produzidos contra a proteína recombinante demonstraram que a proteína está presente de forma mais concentrada na bolsa flagelar de epimastigotas, estrutura intracelular de intensas trocas com o meio externo (Cardoso, 2022). Essa citolocalização corrobora os achados de estudos anteriores que mostram que a TOPTc é secretada por via não clássica, visto que a enzima não apresenta peptídeo sinal (Queiroz, 2013; Queiroz et al., 2014, Mandacaru, 2019).

1.7 ABORDAGENS *IN SILICO* NO ESTUDO DAS PROTEASES

Os experimentos *in vivo* e *in vitro* são as metodologias mais utilizadas no âmbito da pesquisa básica para avaliar toxicidade, estabilidade, interação, entre outros, de uma molécula ou composto diante de um ser vivo, utilizando organismos modelo para essa avaliação, que posteriormente é extrapolada para sistemas biológicos humanos (Alves; Streit; Pizzolato, 2023). No entanto, como toda metodologia, possuem desvantagens associadas como altos custos, necessidade de aprovação de conselhos e comitês de ética para uso de animais na pesquisa, necessidade de equipamentos, equipe treinada e experiente em cultivo celular, estabelecimento de padrões de funcionamento bem definidos, necessidade de um ambiente específico para a realização dos experimentos e grande tempo despendido na repetição dos testes (Fröhlich; Salar-Behzadi, 2014; Wagmann; Gampfer; Meyer, 2021).

As abordagens *in silico* surgem como alternativa frente a algumas dessas problemáticas, especialmente em relação a crescente questão ética relacionada ao uso de animais na pesquisa, poupando tempo e dinheiro. O termo *in silico*, estabelecido no final da década de 80 (Saeidnia;

Manayi; Abdollahi, 2013), ao contrário das metodologias tradicionais *in vitro* e *in vivo*, refere-se a simulações ou testes feitos através de um computador. Possui como vantagens o poder preditivo sobre o comportamento dos sistemas, reprodutibilidade, segurança, acesso a sistemas e fenômenos que são muito difíceis ou impossíveis de serem observados, triagem de extensas bibliotecas, custo e tempo menores que nos métodos tradicionais (Yusuf, 2023). Contudo, assim como nas metodologias anteriores, também possui desvantagens como necessidade de curadoria de alguns processos ou programas, dificuldade ou impossibilidade de decifrar funções de regulação combinatória que envolvem várias entradas (Tang et al., 2015), complexidade da dinâmica molecular, dependência de uma grande quantidade de dados para o treinamento de um algoritmo (Chang et al., 2022).

Durante a pandemia de COVID-19 vários estudos envolvendo abordagens *in silico* para a descoberta e reposicionamento de fármacos que pudessem auxiliar no tratamento da doença foram desenvolvidos. Dentre os medicamentos selecionados temos, fenazopiridina, abemaciclibe, promazina, tyverb, pirenzepina, ebastina e alectinibe (Kowalewski; Ray, 2020), atazanavir, remdesivir e efavirenz (Beck et al., 2020), vismodegibe, gemcitabina, clofazimina, celecoxibe, brequinar, conivaptan, bedaquilina, tolcapone e pranlukast (Ke et al., 2020), entre outros. Como metodologias *in silico* utilizadas nesses trabalhos temos: eliminação recursiva de atributos com validação cruzada (CV-RFE), impressões digitais de conectividade estendida (ECPF) (Kowalewski; Ray, 2020), modelos de interação baseado em aprendizagem profunda (Beck et al., 2020), triagem virtual, geração de conjuntos de dados e modelos de inteligência artificial (Ke et al., 2020).

Apesar de algumas desvantagens associadas, as pesquisas *in silico* podem ser utilizadas para o estudo de uma ampla gama de sistemas, constituindo-se como alternativa eficiente no estudo das proteases, especialmente no campo da identificação de novos alvos terapêuticos, reposicionamento de fármacos, dobramento de proteínas e interações moleculares (Yusuf, 2023).

Portanto, a combinação dessas diferentes metodologias pode ser a chave no desenvolvimento das pesquisas atuais, principalmente as que possuem poucos recursos humanos e financeiros, superando os obstáculos inerentes à pesquisa básica.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças tropicais negligenciadas não estão apenas ligadas à localização geográfica, mas às desigualdades presentes nas condições socioeconômicas dos países afetados. O alto grau de morbidade das DTN causa agravos para a saúde pública e para a economia do país. Infelizmente, essa situação ainda é recorrente no Brasil, afetando comunidades marginalizadas que possuem baixa visibilidade e pouca voz política, dificultando o rompimento do ciclo da pobreza e consequentemente das doenças negligenciadas (Campos, 2008; Brasil, 2023).

Uma das consequências da pandemia de COVID-19 foi o interrompimento de algumas ações que tinham como objetivo prevenir, controlar e cuidar das doenças negligenciadas (Mckay et al., 2021), como a Doença de Chagas. Esse cenário revela a importância do desenvolvimento de novas estratégias que visem a identificação de moléculas capazes de se tornarem uma alternativa ou complementação ao tratamento atual, assim como a necessidade e urgência no investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) para a validação de novos medicamentos.

Neste contexto, as proteases desempenham papéis fundamentais em diferentes etapas do metabolismo e ciclo de vida dos parasitos, a thimet oligopeptidase de *T. cruzi* é um alvo molecular promissor a ser explorado para o desenvolvimento de inibidores. A utilização de estratégias computacionais como modelagem de estruturas 3D de proteínas e *docking* molecular aplicados à triagem virtual associadas com metodologias tradicionais, são alternativas rápidas, ecológicas e economicamente viáveis para priorização de compostos potencialmente ativos utilizando bibliotecas relativamente grandes de compostos (Gimeno et al., 2019). Diante disso, esse projeto integra uma linha de pesquisa focada em proteases de patógenos como potenciais alvos no desenvolvimento de terapêuticas eficazes que minimizem os efeitos adversos e incentivem os pacientes a aderir e continuar o tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Integrar metodologias experimentais e computacionais para identificar *hits* com atividade contra a enzima thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* recombinante (rTOPTc) e continuar a caracterização bioquímica e estrutural da enzima.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir e refinar modelos tridimensionais da TOPTc, utilizando diferentes servidores;
- Triagem virtual de bibliotecas de compostos contra TOPTc, utilizando *docking* molecular e outros filtros computacionais;
- Priorizar compostos e inspeção visual baseada em Química Medicinal;
- Determinar a capacidade inibitória dos compostos sobre a TOPTc; atividade enzimática, tripanocida e citotoxicidade dos inibidores;
- Avaliar a dependência da enzima por íons metálicos;
- Determinar o estado de oligomerização da TOPTc;
- Determinar a capacidade de clivagem de peptídeos hormonais bem como os sítios de clivagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

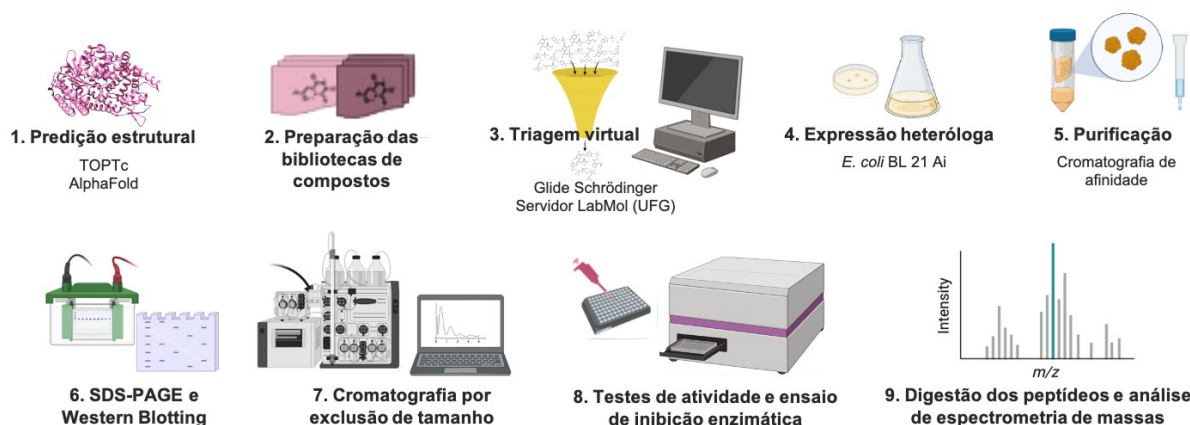


Figura 12. Representação ilustrativa da metodologia utilizada no trabalho. Fonte: Imagem/ilustração criada com BioRender.

4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA

A sequência de aminoácidos da metaloprotease foi obtida através da base de dados do *Kinetoplastid Informatics Resource*, TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>), sob o código TcCLB.506411.10, podendo também ser encontrada disponível na base de dados The Universal Protein Resource, UniProt (<https://www.uniprot.org>), sob o número de acesso Q4CVA3, sendo constituída de 686 aminoácidos. A sequência foi submetida ao banco de dados InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e ao *Conserved Protein Domain Family*, CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), a fim de identificar características conservadas da família a qual é pertencente, assim como possíveis aminoácidos envolvidos na formação do sítio ativo, fendas catalíticas e motivos estruturais. Além disso, o MEROPS foi utilizado para buscar informações em relação às diferentes peptidases da família M3 e aos inibidores descritos na literatura.

4.3 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi utilizada para procurar proteínas com sequências semelhantes através de alinhamentos locais. As sequências obtidas foram escolhidas com base nos parâmetros de percentual de identidade e E-value. Posteriormente, foi realizado um

alinhamento múltiplo de sequências utilizando a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). As sequências primárias e estruturas secundárias foram alinhadas de acordo com os resíduos conservados e editadas com a ferramenta ENDscript, versão 2.0 (<https://endscript.ibcp.fr/ESPript/ENDscript/index.php>), para facilitar a visualização das semelhanças na sequência e estrutura.

4.4 ÁRVORE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética foi construída com a ferramenta *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, MEGA versão 11.0.3 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021). O alinhamento entre as sequências de proteínas também foi realizado através do mesmo software usando como ferramenta de alinhamento o Clustal Omega. As sequências usadas no alinhamento, assim como a sequência da thimet oligopeptidase de *T. cruzi* (XP_806053.1), foram obtidas do banco de dados NCBI ou UniProt. Para a construção da árvore foi utilizado o método *neighbor-joining* e como grau de confiabilidade o uso do *bootstrap* para 1000 replicatas. Duas sequências foram utilizadas como grupo externo nessa análise (dipeptidil peptidase 4 (DPP4) de *Homo sapiens* e oligopeptidase dependente de zinco de *Babala massiliensis*). Por fim, as árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no servidor *Interactive Tree Of Life* (iTOL) (<https://itol.embl.de>).

4.5 PREDIÇÃO DE MODELOS TRIDIMENSIONAIS DA PROTEÍNA

O *AlphaFold Protein Structure Database* (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) foi utilizado para a obtenção dos modelos. Outros servidores (trRosetta, SWISS-MODEL, I-TASSER e Phyre2), que fazem o uso de diferentes metodologias, também foram utilizados para a construção dos modelos. Para a validação final, os modelos gerados foram alinhados com o PDB da estrutura base, 2O36, por meio do software PyMOL versão 2.5.0 ou UCSF Chimera versão 1.15 e o valor de Root Mean Square Deviation (RMSD) foi calculado.

4.6 AVALIAÇÃO DOS MODELOS TRIDIMENSIONAIS DA PROTEÍNA

A avaliação dos modelos tridimensionais gerados foi feita utilizando o RMSD, a média do teste da diferença de distância local prevista (pLDDT), *MolProbity score*, *Clash score* e o *ERRAT score*. O RMSD é uma medida de similaridade entre duas ou mais estruturas de proteínas (Reva; Finkelstein; Skolnick, 1998), é uma característica típica capaz de estimar o movimento de cada átomo (Liu; Watanabe; Kokubo, 2017).

O pLDDT, pode variar de 0 a 100, no qual valores maiores indicam geralmente uma predição mais acurada e uma maior confiança no modelo predito (Mariani et al., 2013). As regiões com pLDDT maior que 90 são geralmente modeladas com alta precisão, o que as torna adequadas para aplicações que dependem de alta precisão, como a caracterização de locais de ligação. As regiões com pLDDT entre 70 e 90 geralmente são bem modeladas, representando uma previsão confiável do backbone. Por outro lado, as regiões com pLDDT entre 50 e 70 têm menor confiança e devem ser usadas com cautela. As regiões com pontuações de pLDDT abaixo de 50 geralmente apresentam uma aparência de espaguete na visualização tridimensional, indicando prováveis regiões desordenadas (Varadi et al., 2024).

O *MolProbity* (<http://molprobity.biochem.duke.edu>) é um servidor de validação de estrutura (Chen et al., 2010) que possui uma coleção valiosa de ferramentas de análise estrutural para a validação ou refinamento de estruturas de proteínas e modelos de homologia (Berndsen, 2021). Portanto, uma estrutura com um *MolProbity score* numericamente menor do que sua resolução cristalográfica real é considerada melhor do que a estrutura média nessa resolução (Chen et al., 2010). A presença de muitas colisões em um modelo questiona sua confiabilidade, o *Clash score* é uma pontuação obtida pelo *MolProbity* que determina uma pontuação para essas colisões, é o número de conflitos por 1000 átomos (incluindo hidrogênios). Considera-se que uma colisão ocorre quando os raios de van der Waals se sobrepõem em $\geq 0,4$ Å, quanto menor o valor do *Clash score* melhor (Chen et al., 2010).

O ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) é um algoritmo de verificação de estrutura de proteína que serve para avaliar o progresso da construção e do refinamento de modelos cristalográficos mantido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), ele é um método que pode detectar regiões incorretas de estruturas de proteínas de acordo com erros que levam a distribuições aleatórias de átomos, que podem ser distinguidas das distribuições corretas (Colovos; Yeates, 1993).

4.7 PREPARAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL DA TOPTC

O modelo tridimensional da TOPTc – Q4D7D2 – foi preparado através do software Glide Maestro utilizando a ferramenta Protein Preparation Wizard (Yang et al., 2021). O grid foi calculado com base na posição do sítio catalítico utilizando a ferramenta Receptor Grid Generation.

4.8 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS

O critério de seleção da biblioteca de compostos foi definido com base na similaridade com inibidores já conhecidos - R2, Cpp-Ala-Pro-Phe-pAb, Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb e JA-2 (Figura 13). A preparação dos ligantes foi realizada por meio do software Glide Maestro utilizando a ferramenta LigPrep considerando um estado de protonação a um pH de 7,4.

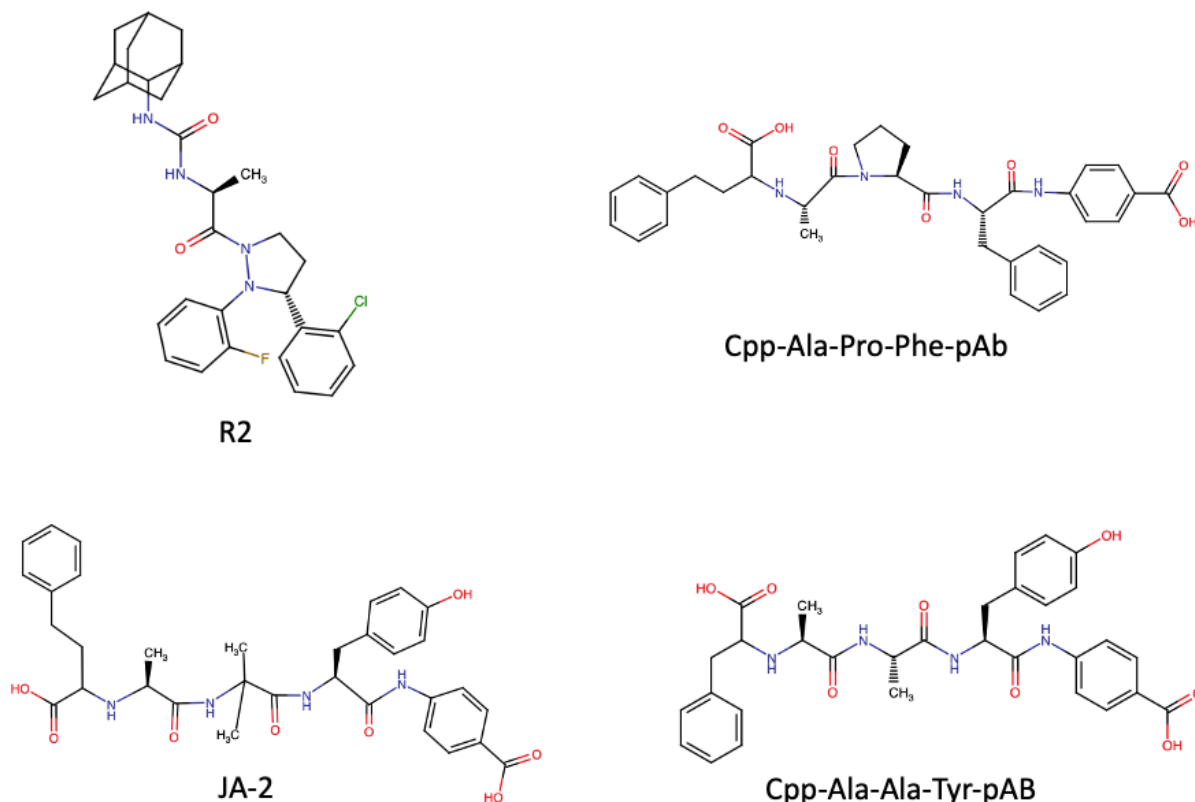


Figura 13. Estrutura química dos inibidores de TOP utilizados como *template* na seleção da biblioteca de compostos.

4.9 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCKING MOLECULAR

A triagem virtual baseada em *docking* molecular (Figura 14), assim como os cálculos de *docking* da biblioteca de compostos (ChemBridge) contra o modelo tridimensional da TOPTc foram realizados utilizando o software Glide Maestro (Yang et al., 2021). As configurações do grid utilizadas para a TOPTc foram: X = -18,10 Å, Y = -17,56 Å e Z = -22,04 Å, com tamanho da caixa de 30 Å. O modo de *docking* utilizado foi standard-precision (SP), considerando a configuração padrão do programa. As análises foram realizadas de forma remota através dos servidores do Laboratório de Planejamento de Fármacos e Modelagem Molecular (LabMol) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

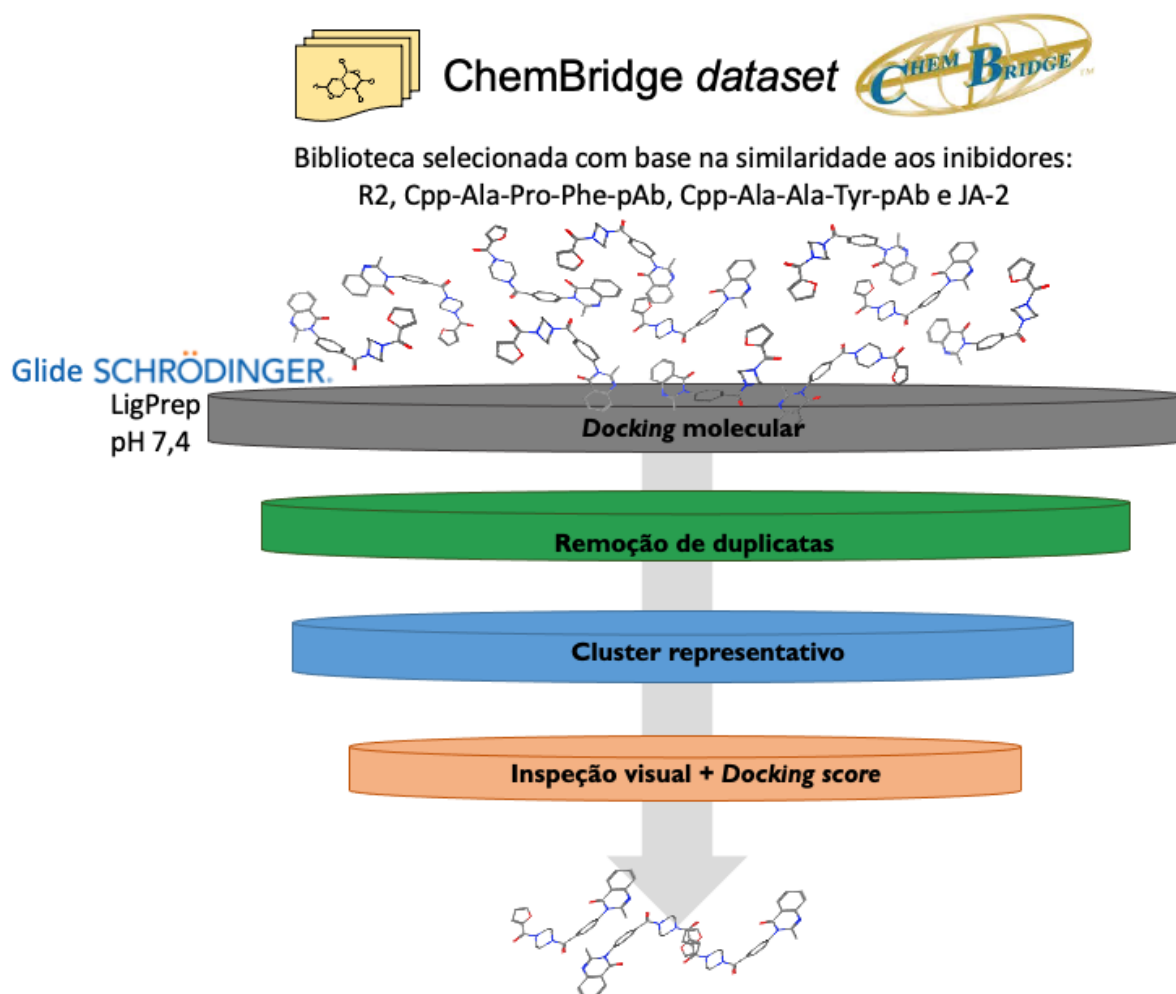


Figura 14. Resumo das etapas realizadas durante a triagem virtual baseada em *docking* molecular.

4.10 ANÁLISES DE INSPEÇÃO VISUAL

Os programas UCSF Chimera e Pymol foram utilizados para visualizar os resultados de *docking*, verificar as poses geradas e interações dos ligantes com o sítio de ligação, assim como para gerar as imagens das estruturas tridimensionais das proteínas com os ligantes. As interações proteína-ligante resultantes do *docking* foram processadas e analisadas nos softwares PyMOL e UCSF Chimera.

4.11 TRIAGEM *IN VITRO* DOS COMPOSTOS SELECIONADOS

Alguns *hits* da triagem virtual foram escolhidos de acordo com as propriedades físico-químicas de fármacos (log P, número de doadores de ligações de hidrogênio, número de aceptores de ligações de hidrogênio, peso molecular) visando otimizar as etapas de triagem *in*

vitro. Os compostos selecionados foram comprados (ChemBridge) e testados numa placa de 96 poços usando a enzima ativa e o mesmo substrato utilizado nos testes de atividade (Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)).

4.12 EXPRESSÃO DA RTOPTC

A expressão e purificação da proteína recombinante foram realizadas de acordo com protocolo já estabelecido em um trabalho anterior com poucas adaptações (Cardoso, 2022). Clones do vetor pET100/D-TOPO® com o gene codificante para a proteína thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (rTOPTc) foram transformados por choque térmico de 45 segundos em banho-maria a 42 °C e incubadas por 2 minutos em gelo, e assim incorporados em *Escherichia coli* BL21-AI competentes. Em sequência, a partir da colônia selecionada pelo antibiótico ampicilina (100 µg/mL), foi realizado o crescimento em 5 mL de meio Luria Bertani (LB) líquido (pré-inóculo) contendo o antibiótico ampicilina na mesma concentração da placa, e crescidos por 16 horas (Cardoso, 2022).

Posteriormente, o pré-inóculo foi diluído e transferido para 500 mL de LB líquido em diluição 1:1000 e incubado a 37 °C e deixado crescer até atingirem a densidade óptica (OD₆₀₀) entre 0,4 e 0,6. Posteriormente, foi realizada a indução por IPTG (0,5 mM) e L-arabinose (0,2%), a temperatura foi reduzida para 20°C, por 18 horas a 200 rpm. Após este processo, a cultura foi centrifugada a 3880 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi congelado a -80 °C para a posterior purificação. O pellet congelado foi vortexado por 2 minutos, seguido de lise bacteriana realizada com o reagente *BugBuster Protein Extraction Reagent* (Novagen) e benzonase (25 µg/mL). Logo depois, foi realizada a centrifugação a 20590 x g a 4 °C por 10 minutos e obtido os extratos solúveis da cultura de bactéria que foram usados na etapa de purificação (Cardoso, 2022; Ramos, 2023).

4.13 PURIFICAÇÃO DA RTOPTC

A purificação da enzima recombinante foi feita por cromatografia de afinidade usando a resina *HIS-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma) eluindo a amostra em tampão (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0) usando concentrações crescentes de imidazol (Cardoso, 2022). Posterior a isso, temos a cromatografia de exclusão por tamanho (gel filtração) utilizando a coluna Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com fosfato de sódio (20 mM, pH 7,0), antes de cada execução. As amostras foram diluídas no tampão utilizado para o equilíbrio da coluna e injetaram-se 100 µL da amostra a um fluxo de 0,5 mL/min à temperatura ambiente.

A absorção a 280 nm foi monitorada e frações de 500 µL foram recolhidas e analisadas por SDS-PAGE com ou sem a presença de SDS (0,2%) e com ou sem aquecimento prévio das amostras (Adaptado de Motta et al., 2012). Para a calibração da coluna, foram utilizadas seis proteínas (ferritina, álcool desidrogenase, conalbumina, ovalbumina, anidrase carbônica e ribonuclease A) com raios de Stokes conhecidos. A curva de calibração (Figura 25) foi traçada usando o coeficiente de distribuição da fase de gel (K_{av}) e o logaritmo do peso molecular ($\log MW$). $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_c - V_o)$ em que V_e = volume de eluição, V_o = volume vazio da coluna (7,54 mL com base no volume de eluição de Blue dextran), V_c = volume geométrico da coluna (24 mL).

4.14 ANÁLISE EM SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de 10% foi realizada para caracterizar o tamanho e a pureza da enzima recombinante. A corrida foi realizada usando um sistema de eletroforese com cuba para quatro géis (Bio-Rad). Adicionou-se às amostras tampão de amostra (Tris 50 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol 0,1%). As amostras foram incubadas a 95°C por 5 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 10%. Foram aplicados 10 µL de cada fração (solúvel ou insolúvel) de suas respectivas eluições por poço do gel. Foi utilizado uma voltagem de 90 V até a amostra atravessar o gel concentrador, aumentando-se para 120 V quando a amostra penetrou para o gel de separação. A eletroforese foi realizada a temperatura ambiente e após o término da corrida, os géis foram corados com solução corante (contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25%, metanol 45% e ácido acético 10%) por mais de 1 h e descorado com solução descorante (contendo metanol 45% e ácido acético 10%) até a visualização das bandas. As massas moleculares das proteínas foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares (*BenchMark protein ladder* (Invitrogen) ou *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad)).

4.15 ANÁLISES POR WESTERN BLOT OU IMMUNOBLOTTING

Com o objetivo de confirmar a expressão da proteína recombinante, foi realizada a análise por *immunoblotting*. Um gel espelho de poliacrilamida foi transferido para membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0,45 µm, GE Healthcare). A membrana foi submersa em tampão de transferência Towbin (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (w/v); e metanol 20% (v/v)) gelado, por 10 min antes do início da transferência. Para a transferência, utilizou-se o sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), corrente constante de 350

mA por 1 h. Após a transferência, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau (Ponceau S 0,2% w/v; ácido acético 1%) por 5 min e lavada com água ultrapura, permitindo assim visualizar as bandas transferidas.

A membrana foi bloqueada utilizando solução salina tamponada com Tris (TBS – Tris 50 mM pH 7.5; e NaCl 150 mM) contendo 5% de leite (w/v) por 1 h a temperatura ambiente sob agitação contínua. Logo após, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-His (Sigma Aldrich) diluído 1:2000 em TBS contendo 0,1% de Tween 20 (v/v) (TBS-T) e 1% de leite desnatado (w/v) por 1 h sob agitação leve. Em seguida, a membrana foi lavada cinco vezes por 5 min a temperatura ambiente, sob agitação leve, com TBS contendo 0,1% de Tween 20 e incubada com o anticorpo secundário diluído em TBS-T (1:30000) e leite 1% (w/v) por 1 h, sob agitação leve. Depois, a membrana foi lavada cinco vezes, ainda sob agitação, com TBS-T. Imediatamente após as lavagens, as bandas de proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato quimioluminescente de peroxidase (ECLTM Prime *Western Blotting* System, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). As massas moleculares das proteínas foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares (*Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad)).

4.16 TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade específica da protease foi avaliada usando o substrato fluorogênico Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp) (Bachem), em um tampão de reação (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0), contendo 20 mM de substrato em um volume final na placa de 100 μ L submetido a diferentes concentrações de DTT (0,5 mM, 5 mM) e de fenantrolina. A liberação de Mca ou AMC (7-amino-4-metilcumarina) foi registrada em um leitor de fluorescência de microplacas de 96 poços (SpectraMax® M5) em modo cinético a cada 1 minuto por 15 minutos a 320 nm de excitação e 405 nm de emissão.

4.17 ENSAIO *IN SILICO* DE AFINIDADE A DIFERENTES ÍONS METÁLICOS

O servidor Metal Ion-Binding site prediction and modeling server, MIB2 (<http://combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/>), foi utilizado para realizar a predição de afinidade a diferentes metais. A sequência completa da proteína foi submetida contra um total de 18 íons metálicos (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{+} , Au^{+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sm^{3+} e Sr^{2+}) disponíveis para análise na plataforma. Vários sítios de ligação podem

ser analisados simultaneamente, no entanto, o foco da análise foi em relação aos resíduos H474, E475, H478 e E503.

4.18 ENSAIO *IN VITRO* DE AFINIDADE A DIFERENTES ÍONS METÁLICOS

Com o objetivo de averiguar se o íon de zinco do sítio catalítico da rTOPTc poderia ser substituído por outro cátion, testes de afinidade a diferentes íons metálicos foram realizados. Os íons metálicos usados nos testes *in vitro* foram: Ca^{2+} , K^{+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Na^{+} . Os testes foram realizados em triplicata em placas de 96 poços usando a mesma concentração (500 μM) para cada um dos íons metálicos, além disso, os testes também possuíam a presença de controle positivo (enzima não tratada com EDTA na presença de tampão fosfato com 5 μM de cloreto de zinco), e negativo (enzima tratada com EDTA e sem zinco adicionado no tampão). Todos os testes, com exceção do controle positivo, foram feitos com a enzima ativa e quelada com EDTA (100 mM).

4.19 TESTE DE OXIDAÇÃO

O teste de exposição a agentes oxidantes foi feito em triplicata utilizando a enzima ativa sem nenhum tipo de tratamento, além do agente oxidante, em um volume final de reação de 100 μl utilizando duas concentrações diferentes, 1 mM e 10 mM, de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

4.20 DIGESTÃO DOS PEPTÍDEOS HORMONAIS PARA ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSA

Os ensaios de clivagem foram realizados com a rTOPTc purificada e os seguintes peptídeos: bradicinina, hormônio luteinizante, angiotensina I e angiotensina II. A digestão dos peptídeos foi realizada utilizando 300 ng da enzima purificada, as reações foram incubadas por 1 h e depois submetidas a aquecimento por 3 h, logo após as soluções foram congeladas a -20°C para a posterior análise no espectrômetro de massas. As massas dos fragmentos foram determinadas por espectrometria de massa no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBPQ) da Universidade de Brasília (UnB).

4.21 TESTE DE DESNATURAÇÃO

Os ensaios de desnaturação térmica medida pela fluorescência do triptofano foram realizados em um espectrofluorímetro FP-6500 (Jasco) equipado com um suporte de célula com

termostato Peltier ETC-273 que foi utilizado para as medições. Os espectros de fluorescência foram registrados na faixa de comprimento de onda de 300 a 450 nm na faixa de temperatura de 10 a 90 °C utilizando o tampão fosfato de sódio (20 mM pH 7,0). As análises foram feitas no Laboratório de Biofísica Molecular da UnB.

4.22 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A ferramenta utilizada para análise estatística e montagem dos gráficos foi o Graphpad Prism versão 8.2.1. Para analisar a variância em grupos amostrais com número maior que 2, foi aplicado análise de variância One-way (ANOVA One-way) ou Two-way, de acordo com o caso, seguido do teste com múltiplas comparações de Tukey. O valor de indicação de significância foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA

A sequência da proteína thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* possui um motivo de ligação ao zinco conservado, característico de metaloproteínas do clã MA, composto pelos resíduos de aminoácidos HEFGH. O resíduo de glutamato (E503) presente 25 aminoácidos após esse motivo (Figura 15) também é importante para a interação com o íon metálico.

Q4D7D2	1	MRMALRIFADV	T	ASKCAVLFPKNVSACQVVAEEAK	R	AMEKLNAIYSFEGNRTFDNTA	V	AADIAAAEFD	
Q4CVA3	1	MRMALRIFADV	T	ASKCAVLFPKNVSACQVVAEEAK	R	AMEKLNAIYSFEGNRTFDNTA	V	AADIAAAEFD	
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	71	VSLSLLSVIMSVST	V	KEIREEANKQIVELKSFEIDNFQSNKRLFEALKEVSQSSQYKE	K	Y	LEG	NKDKEYS	
Q4CVA3	71	VSLSLLSVIMSVST	V	KEIREEANKQIVELKSFEIDNFQSNKRLFEALKEVSQSSQYKE	K	Y	LEG	NKDKEYS	
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	141	YWLDEELRNFRKGMELPDNKFQEVVALEKELSALCTTFSRNISEDQSE	I	L	A	A	E	E	L
Q4CVA3	141	YWLDEELRNFRKGMELPDNKFQEVVALEKELSALCTTFSRNISEDQSE	I	L	A	A	E	E	L
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	211	ADDGRFILKMDYPTFFGVMKNCEVAATRQSMARAASNKAYPVNERVLKEI	I	A	K	R	Q	A	L
Q4CVA3	211	ADDGRFILKMDYPTFFGVMKNCEVAATRQSMARAASNKAYPVNERVLKEI	I	A	K	R	Q	A	L
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	281	LSDKMAKSPDVAKAFVD	L	I	P	R	L	Q	K
Q4CVA3	281	LSDKMAKSPDVAKAFVD	L	I	P	R	L	Q	K
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	351	ETEIQEYFPLDVTVKGLFDIYQAFDITFTRIDNGFELWHESAFTLQVKDNATGKTLGHVIMDLFPREGK							
Q4CVA3	351	ETEIQEYFPLDVTVKGLFDIYQAFDITFTRIDNGFELWHESAFTLQVKDNATGKTLGHVIMDLFPREGK							
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	421	YSHACCHSVVPP	L	L	H	G	S	E	D
Q4CVA3	421	YSHACCHSVVPP	L	L	H	G	S	E	D
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	491	TFAGTNVKWDFV	E	L	P	S	Q	M	L
Q4CVA3	491	TFAGTNVKWDFV	E	L	P	S	Q	M	L
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	561	YSLEVFSAPFAGGKDPNKLDTAELMRSIRSRI	S	P	D	I	K	E	D
Q4CVA3	561	YSLEVFSAPFAGGKDPNKLDTAELMRSIRSRI	S	P	D	I	K	E	D
		*****		*****		*****		*****	
Q4D7D2	631	VYEYIKSRNGLLDPVLG	N	H	Y	V	S	N	I
Q4CVA3	631	VYEYIKSRNGLLDPVLG	K	R	Y	I	S	K	I
		*****		*****		*****		*****	

Figura 15. Alinhamento das sequências de TOPTc (Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3) e Tc00.1047053511237.10 (Q4D7D2)). O motivo de ligação ao zinco característico está destacado em verde, o resíduo de glutamato (E503), importante para a interação com o íon metálico, está destacado em vermelho e os polimorfismos de cada uma das sequências estão destacados em magenta.

A sequência obtida é derivada do protozoário *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener, possuindo dois alelos disponíveis no banco de dados de tripanossomatídeos (Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3) e Tc00.1047053511237.10 (Q4D7D2)). A análise inicial das sequências revelou que ambas possuem modelos tridimensionais preditos pelo servidor Alphafold (Figura 16), apresentando alta sobreposição, assim como esperado.



Figura 16. Modelos tridimensional da TOPTc preditos pelo servidor Alphafold. O modelo obtido através da sequência Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3) é representado pela cor ciano, enquanto o Tc00.1047053511237.10 (Q4D7D2) é representado pela cor laranja.

Por se tratar de uma cepa híbrida, é importante avaliar o comportamento estrutural dos polimorfismos resultantes das substituições de aminoácidos entre os dois alelos da cepa CL Brener, pois alterações podem impactar na atividade e/ou inibição da enzima. Conforme destacado no alinhamento da figura 11 e na sobreposição estrutural, os dois alelos da TOPTc possuem 18 polimorfismos entre si destacados na Figura 17.

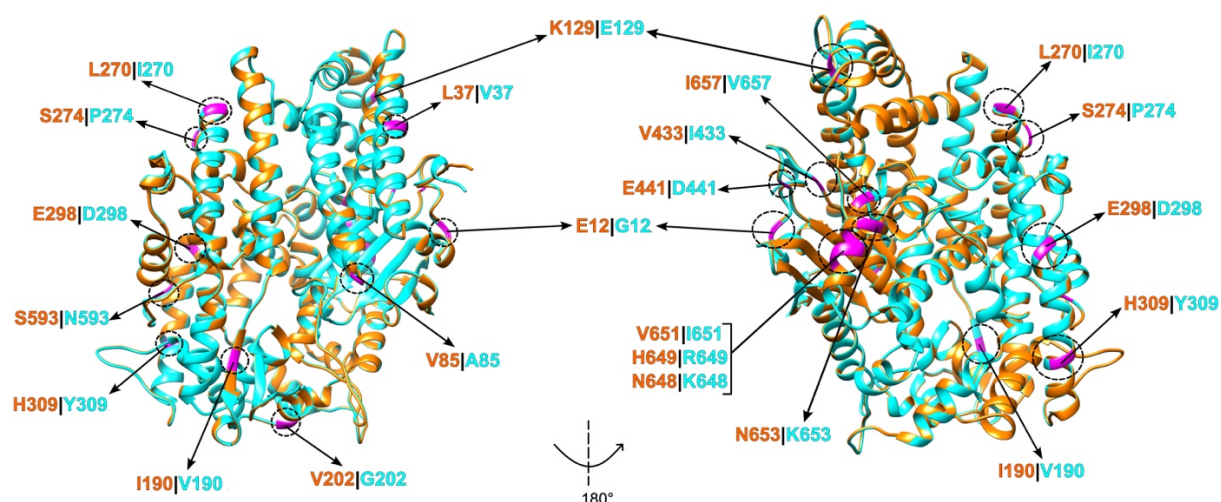


Figura 17. Polimorfismos presentes nas diferentes sequências da TOPTc representados no modelo tridimensional. Os 18 polimorfismos presentes nas sequências estão representados na cor magenta nas estruturas. As duas representações dos modelos de TOPTc (Q4CVA3 (ciano) e Q4D7D2 (laranja)) sobrepostos estão rotacionadas em 180° em torno do eixo y.

5.2 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E FILOGENIA

A fim de unir informações sobre a homologia, alinhamentos locais foram obtidos através do servidor BLASTp. O alinhamento local forneceu um resultado com 1000 entradas das quais 28 foram selecionadas para a construção da árvore filogenética. Das sequências obtidas algumas foram escolhidas com base nos parâmetros de percentual de identidade e E-value, enquanto outras foram escolhidas de forma arbitrária considerando diferentes grupos taxonômicos de forma a identificar relações evolutivas entre elas.

Posteriormente, buscou-se analisar mais profundamente, dados sobre a estrutura e possível função de alguns desses homólogos. Através do alinhamento foi possível observar uma grande conservação de motivos característicos de metaloproteases, os domínios preditos também indicaram funções relacionadas à atividade de metaloendopeptidases (GO:0004222) e proteólise de forma generalizada (GO:0006508), podendo estar envolvida no processo catabólico de proteínas ou na regulação da proteólise em si, positiva ou negativa.

Das 28 entradas, 15 eram correspondentes a tripanossomatídeos. Todas as entradas correspondentes ao gênero *Trypanosoma*, que foram selecionadas, apresentavam mais de 69% de identidade (Tabela 1), sendo a primeira entrada correspondente à própria sequência inserida na busca (XP_806053.1 | Q4CVA3). O alinhamento múltiplo mostrou a presença de 47 resíduos totalmente conservados e 263 altamente conservados entre todas as 28 sequências alinhadas (Figura 18).

Tabela 1. Entradas correspondentes ao gênero *Trypanosoma* que foram selecionados para compor a árvore filogenética

Nome científico	E value	Identidade (%)	Tamanho da sequência	Número de acesso (UniProt)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0.0	100	686	Q4CVA3
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0.0	97,4	686	Q4D7D2
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	0.0	96,4	686	K2NSG8
<i>Trypanosoma conorhini</i>	0.0	82,9	683	A0A3R7N4N1
<i>Trypanosoma rangeli</i>	0.0	82,7	684	A0A422MUB5
<i>Trypanosoma theileri</i>	0.0	79,4	685	A0A1X0NTS0
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	0.0	69,5	685	Q57U35
<i>Angomonas deanei</i>	0.0	67,2	401	A0A7G2C850
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	0.0	65,2	683	A0A0M9GBL8
<i>Leishmania braziliensis</i>	0.0	64,4	607	A4HF12
<i>Leishmania major</i>	0.0	62,7	685	Q4Q937
<i>Leishmania infantum</i>	0.0	62,7	685	A4I291
<i>Strigomonas culicis</i>	0.0	61,6	683	S9TZ27
<i>Bodo saltans</i>	0.0	56,2	684	A0A0S4JRG5
<i>Perkinsela sp.</i>	3,4e-158	36,9	669	A0A0L1KWT0
<i>Babela massiliensis</i>	4,7e-146	38,0	693	V6DH25
<i>Dimargaris verticillata</i>	2,7e-120	35,5	668	A0A9W8B1Y5
<i>Penaeus vannamei</i>	1,4e-119	35,4	667	A0A3R7PE80
<i>Danio rerio</i>	1,2e-123	35,3	686	Q6DHR6
<i>Xenopus laevis</i>	4,4e-119	34,4	683	A0A8J0U0W1
<i>Salpingoeca rosetta</i>	4,2e-115	34,0	656	F2UG91
<i>Chelonoidis abingdonii</i>	4,6e-117	33,5	653	A0A8C0G9D2
<i>Actinia tenebrosa</i>	1,0e-122	33,4	665	A0A6P8HZ08
<i>Naja naja</i>	1,6e-115	33,3	684	A0A8C6V751
<i>Mus musculus</i>	8,3e-121	33,1	687	Q8C1A5
<i>Crassostrea virginica</i>	3,6e-117	33,1	707	A0A8B8CZI1
<i>Latimeria chalumnae</i>	8,3e-116	32,4	684	H3A2K4
<i>Homo sapiens</i>	6,7e-116	32,1	689	P52888

Figura 18. Visão geral do alinhamento das 28 sequências obtidas através do servidor BLASTp, no qual a thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (TOPTc (Tc00.1047053506411.10 (Q4CVA3))) serviu de entrada para a busca. O servidor ESPript 3.0 foi usado para gerar o alinhamento, a caixa azul indica as similaridades na sequência, resíduos idênticos são representados com caracteres brancos em fundo vermelho, resíduos conservados aparecem destacados em vermelho com fundo branco, resíduos não conservados são representados na cor preta e os asteriscos representam uma marcação que é feita a cada 10 resíduos de aminoácido.

A árvore filogenética construída separou os diferentes grupos em dois grandes clusters compostos por protozoários e metazoários (Figura 19), o maior deles é composto principalmente por tripanossomatídeos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* que possuem importância médica e socioeconômica. Duas outras sequências (dipeptidil peptidase 4 (DPP4) de *Homo sapiens* e oligopeptidase dependente de zinco de *Babela massiliensis*) foram escolhidas como grupo externo na construção da árvore filogenética.

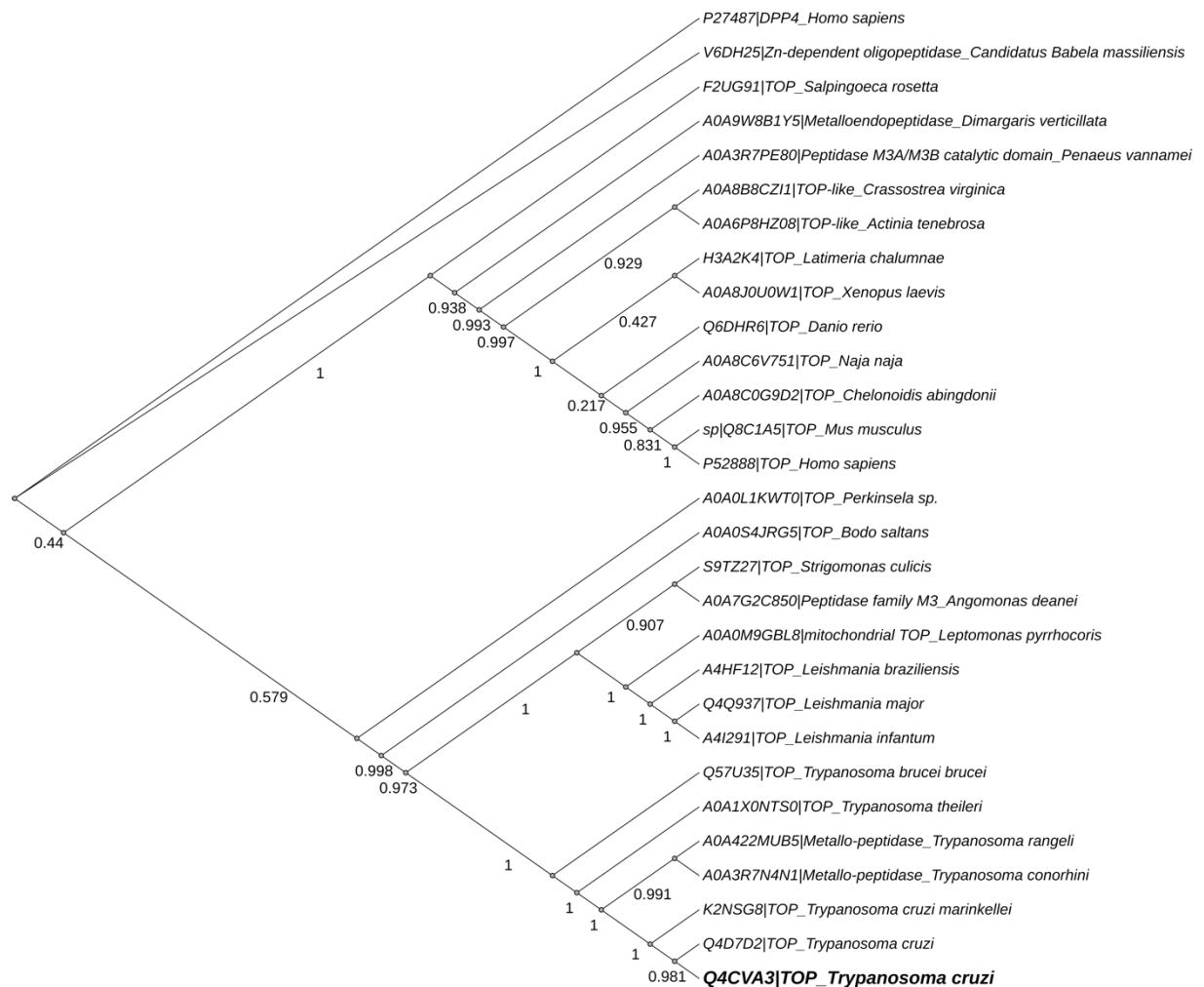


Figura 19. Árvore filogenética. O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado usando o Clustal Omega e as análises evolutivas foram inferidas usando o método *Neighbor-Joining* conduzido no MEGA 11 (versão 11.0.13). O servidor Interactive Tree Of Life (iTOL) foi usado para visualização e edição da árvore filogenética. As

sequências de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) de *Homo sapiens* e Oligopeptidase dependente de zinco de *Babesia massiliensis* foram usadas como grupos externos.

5.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

A proteína foi expressa em sistema heterólogo utilizando bactérias das linhagens *E. coli* BL21-AI e *E. coli* BL21 (DE3). A enzima foi expressa na fração solúvel em baixa temperatura (20 °C). A protease recombinante possui uma cauda de histidina e foi purificada por cromatografia de afinidade por níquel em coluna e conforme observado na Figura 20 sua expressão foi detectada no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na fração esperada (~78 kDa) de acordo com o marcador de massa molecular e por *Western blotting*. A rTOPTc não foi expressa na fração solúvel a 37 °C. A proteína também foi submetida a condições não desnaturantes e a agentes oxidantes, ainda assim, a sua expressão foi detectada apenas na fração equivalente ao monômero.

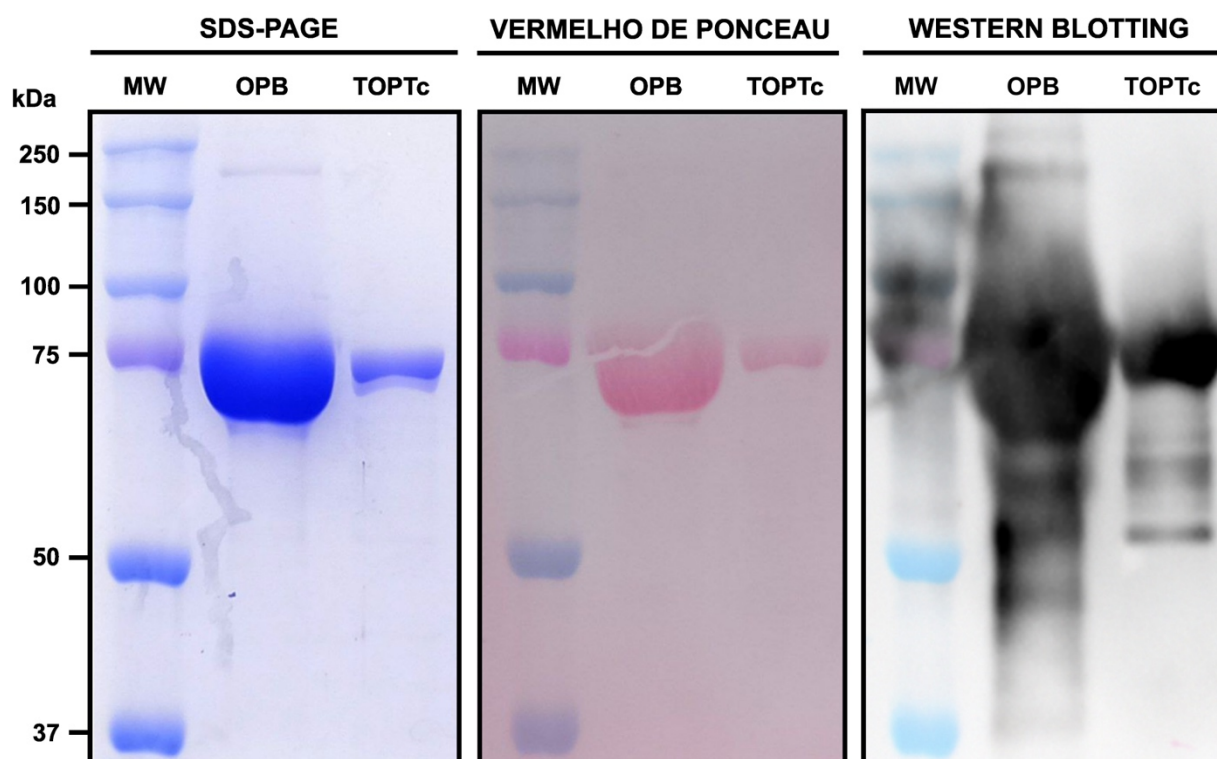


Figura 20. Confirmação da expressão da proteína recombinante. A) SDS-PAGE, corado com coomassie blue. B) Membrana corada com vermelho de ponceau. C) *Western blotting*. MW: marcador de massa molecular (Bio-rad precision plus protein dual color); OPB: oligopeptidase B (utilizada como controle); TOPTc: thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*.

5.4 THIMET OLIGOPEPTIDASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* É DEPENDENTE DE ZINCO PARA SEU FUNCIONAMENTO

Buscando-se analisar a dependência por algum tipo de metal específico, testes *in silico* e *in vitro* foram realizados. Os testes *in silico* consideraram a afinidade de diferentes íons metálicos em relação a todos os resíduos de aminoácidos presentes ao longo da sequência, porém, o foco consistia nos metais que pudessem se ligar aos resíduos do sítio catalítico que coordenam a ligação ao íon metálico (H474, E475 e H478) e também ao glutamato na posição 503 (E503) que também é importante para essa ligação.

Diferentes servidores de predição a íons metálicos (GPSite e M-Ionic) indicaram os resíduos H474, E475, H478 e E503 como preditos a se ligarem ao íon zinco (GPSite score de ligação > 0.5 e M-Ionic logit = 1), um deles (GPSite) também indicou uma predição do íon Mn^{2+} a esses mesmos resíduos com exceção do H475. No entanto, só um deles conseguia fazer predições com até 10 metais (GPSite (4: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) e M-Ionic (10: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , $(PO_4)^{3-}$, $(SO_4)^{2-}$, Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+})).

Procurando entender se outros íons também poderiam apresentar alguma afinidade de ligação aos mesmos resíduos, utilizou-se um terceiro servidor que considera 18 metais em sua análise. O resultado indicou uma afinidade de ligação por outros metais além do zinco (Figura 21A).

Diante desse resultado, testes *in vitro* foram feitos para avaliar a afinidade de diferentes íons metálicos em relação a TOPTc purificada. Os íons metálicos testados foram: zinco, níquel, magnésio, manganês, cálcio, sódio, potássio e ferro (Figura 21B). Os testes foram feitos com a enzima quelada utilizando a mesma concentração (0,5 mM) dos diferentes íons metálicos por poço e na presença de controle positivo (enzima não quelada na presença de tampão fosfato com 5 μM de cloreto de zinco) e controle negativo (enzima quelada sem adição de nenhum íon metálico na presença de tampão fosfato sem cloreto de zinco). O zinco foi o único íon metálico a contribuir significativamente com o aumento da atividade da enzima (Figura 21B). Contudo, o aumento da concentração desse metal não proporcionou um aumento significativo da atividade (Figura 21C), demonstrando que uma pequena quantidade já é suficiente para um bom funcionamento dessa protease.

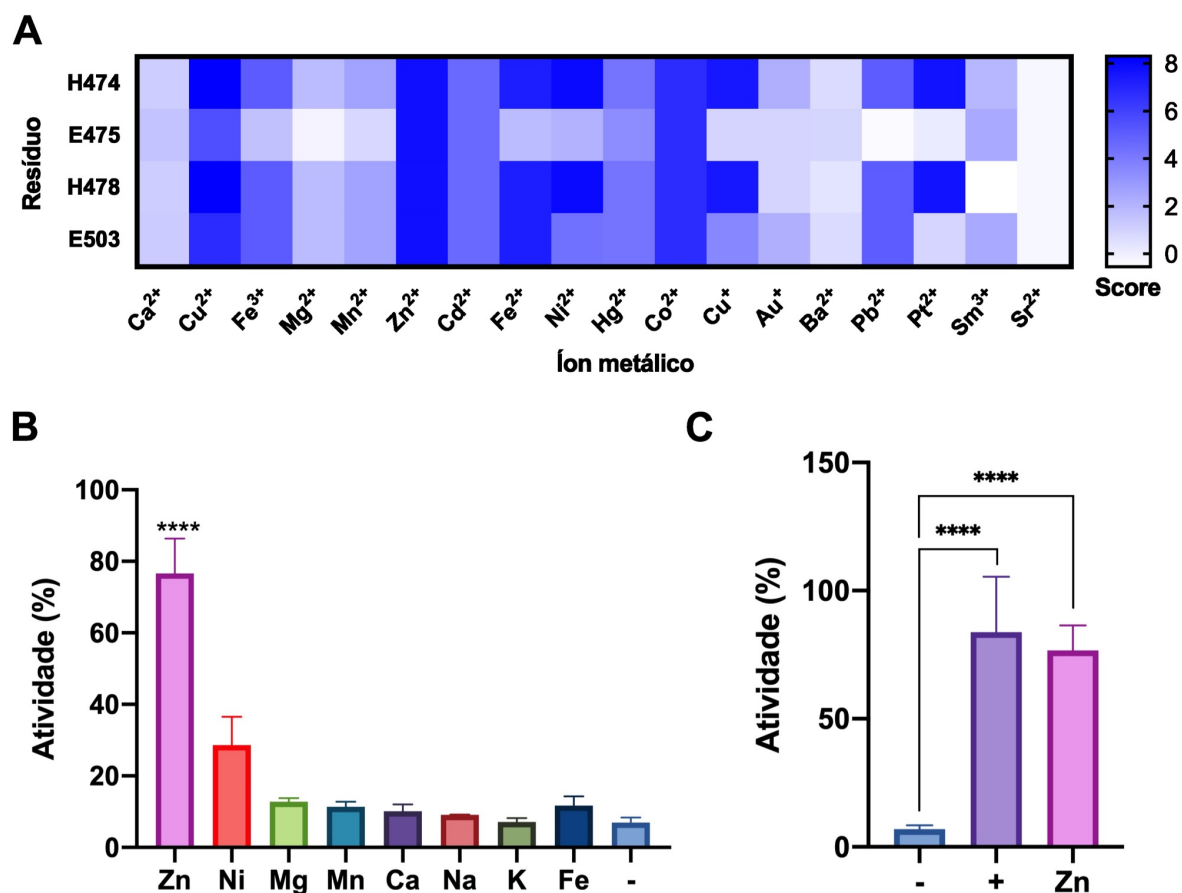


Figura 21. A) Teste *in silico* de afinidade de diferentes íons metálicos aos resíduos H474, E475 e E503 da TOPTc utilizando o servidor MIB2 (<http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB2/>); B) Efeito dos íons metálicos na atividade da TOPTc: A atividade foi testada na presença de diferentes íons metálicos (concentração de 0,5 mM) e sem adição de metal (-); C) Influência do zinco na atividade da TOPTc, (+) enzima não tratada com EDTA e na presença de tampão com 5 μM de cloreto de zinco, (-) enzima tratada com EDTA (100 mM) e sem zinco adicionado ao tampão, (Zn) enzima tratada com EDTA (100 mM) e zinco (0,5 mM). **** $p < 0,0001$.

5.5 EXPOSIÇÃO A AGENTES OXIDANTES

Um dos mecanismos que contribui para a regulação da TOP, além das modificações pós-traducionais, é o processo de multimerização pela formação de ligações dissulfeto intermoleculares (Icimoto et al., 2017), com o objetivo de promover a oligomerização da rTOPTc, ensaios enzimáticos na presença de agentes oxidantes e do substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp), que é específico para a thimet oligopeptidase, foram realizados.

O agente oxidante de escolha para o teste de atividade foi o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizado em duas concentrações diferentes de H_2O_2 (1 mM e 10 mM). Ambas as concentrações inibiram a atividade da enzima de forma significativa (Figura 22A). Isso indica que pode estar havendo a oligomerização da enzima, mas também não se pode descartar um

efeito oxidativo colateral responsável por essa drástica redução. O efeito dose-resposta entre as duas concentrações testadas não foi significativo, por isso concentrações menores deverão ser analisadas para uma conclusão mais precisa.

Além de modular a atividade da rTOPTc, foi observado que o H_2O_2 , nas concentrações testadas, não promoveu a oligomerização da rTOPTc. Novos experimentos de cromatografia por exclusão molecular e ultracentrifugação analítica (AUC) na ausência e presença de H_2O_2 , devem ser realizados, para confirmação.

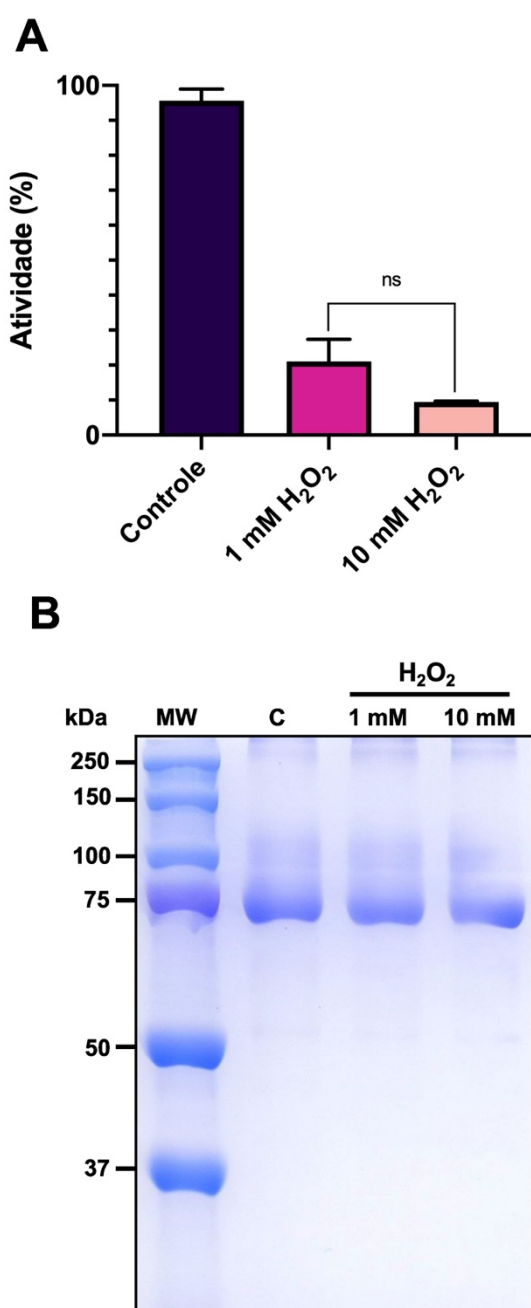


Figura 22. Peróxido de hidrogênio promove a oxidação e modula a atividade da rTOPTc sem interferir no estado de oligomerização. A) Influência do peróxido de hidrogênio na atividade da enzima. Controle: enzima sem

peróxido de hidrogênio. MW: marcador de massa molecular. C: controle. **** $p < 0,0001$; B) SDS PAGE, purificação da TOPTc expressa em *E. coli* BL21-AITM.

5.6 ESTABILIDADE TÉRMICA DA TOPTC

Em um trabalho anterior, foi observado que a TOPTc apresentava temperatura ótima entre 25 e 50 °C, indicando uma significativa estabilidade térmica (Cardoso, 2022). De forma a explorar o comportamento estrutural da enzima mediante a temperatura, foi realizado um teste de desnaturação térmica inferida por meio da fluorescência do triptofano, já que a TOPTc possui sete resíduos de triptofano (W142, W307, W389, W499, W512, W514 e W623). O teste mostrou que a enzima sofre desnaturação entre 50 e 60 °C (Figura 23), o que foi correlacionado positivamente com a mesma temperatura de perda de atividade (Cardoso, 2022).

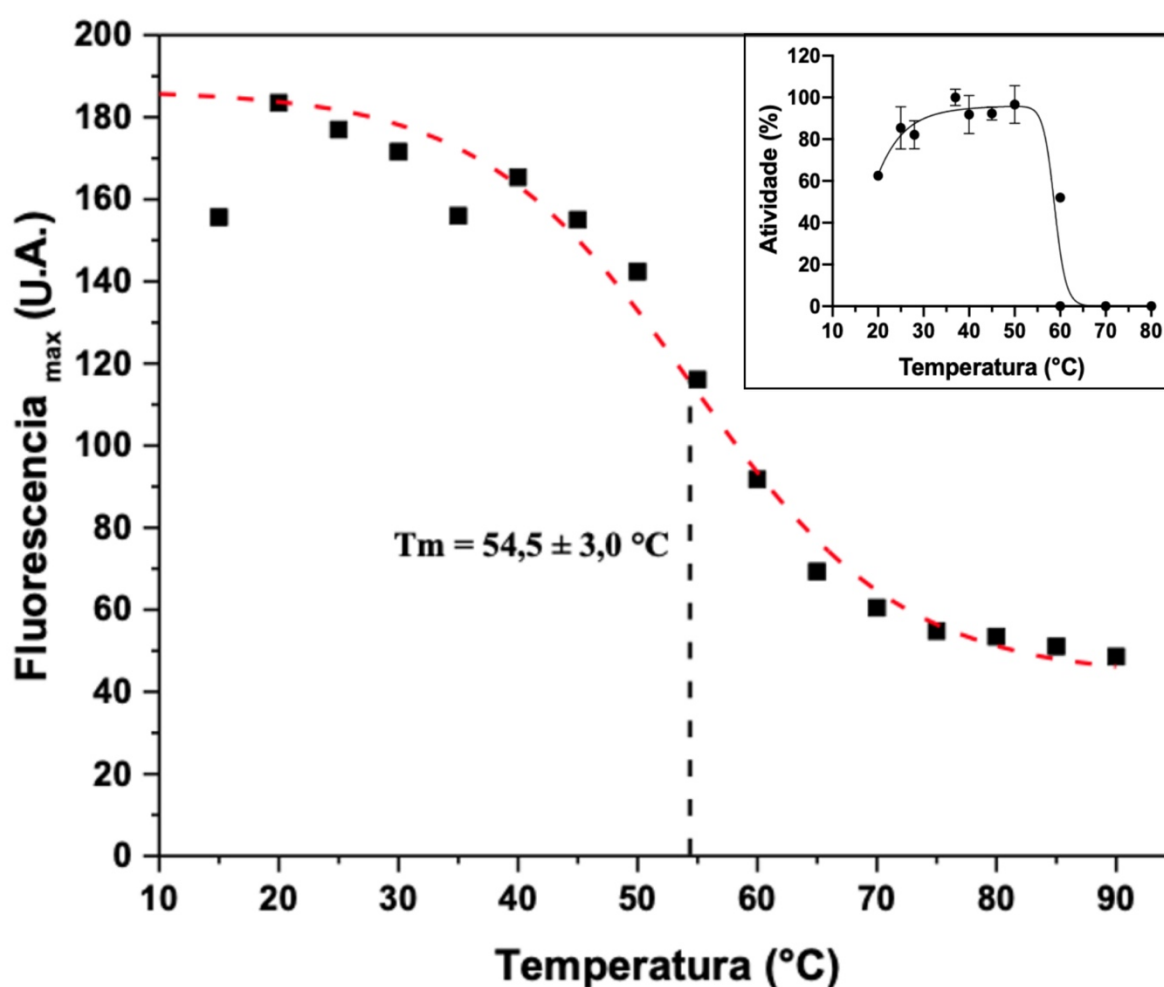


Figura 23. Curva de desnaturação térmica da rTOPTc obtida através da fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura. T_m: temperatura média; U.A.: unidades arbitrárias. No canto superior direito está o gráfico de influência da temperatura na atividade da rTOPTc (fonte: Cardoso, 2022).

5.7 TESTE DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

A estabilidade de armazenamento da enzima foi testada usando a proteína recombinante purificada submetida a duas condições diferentes, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com glicerol (I) e temperatura ambiente (II). Depois de 24 h, a enzima perdeu aproximadamente 50% de atividade em ambos os tratamentos (Figura 24). Contudo, o tratamento I se manteve com uma atividade acima de 45% e enzima ativa, apesar da diferença entre os grupos, mesmo após 14 dias, enquanto o tratamento II com 7 dias já não apresentava atividade alguma (Figura 24). Esses testes indicam a preferência do armazenamento da TOPTc no freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação à temperatura ambiente. Apesar disso, em trabalho anterior (Cardoso, 2022), o armazenamento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se mostrou mais eficiente para a manutenção da atividade da protease, sendo essa condição a escolhida para o restante dos testes.

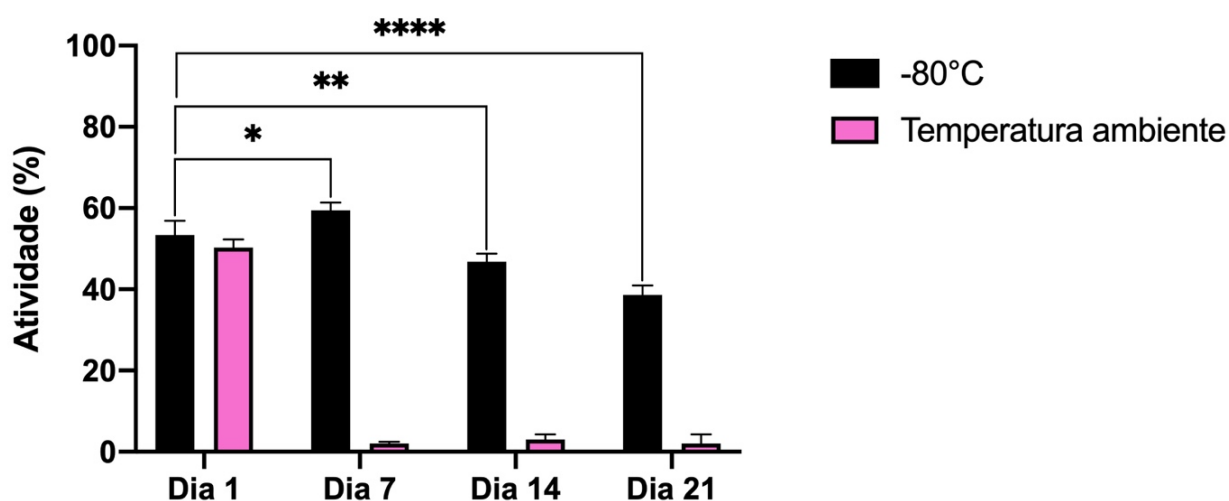


Figura 24. Estabilidade da rTOPTc submetida a diferentes temperaturas, -80°C e temperatura ambiente, ao longo de 21 dias. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5.8 TOPTC É UMA ENZIMA MONOMÉRICA

Análises através da cromatografia de exclusão molecular por tamanho foram feitas para investigar o nível de pureza da amostra purificada e determinar se a proteína biologicamente ativa se encontra na forma de monômero ou algum outro estado oligomérico.

Primeiramente, foram estabelecidas as curvas de calibração utilizando duas misturas (uma de cada vez) que continham um total de seis proteínas (ferritina, álcool desidrogenase, conalbumina, ovalbumina, anidrase carbônica e ribonuclease A) com valores de massa molecular conhecidos e após isso foi calculada a equação da reta com base nos dados dos padrões de massa molecular ($R^2 = 0,9435$) (Figura 25). A equação da curva de calibração,

$Y = -0,2504 \cdot X + 1,594$, foi usada para calcular a massa molecular experimental da proteína purificada.

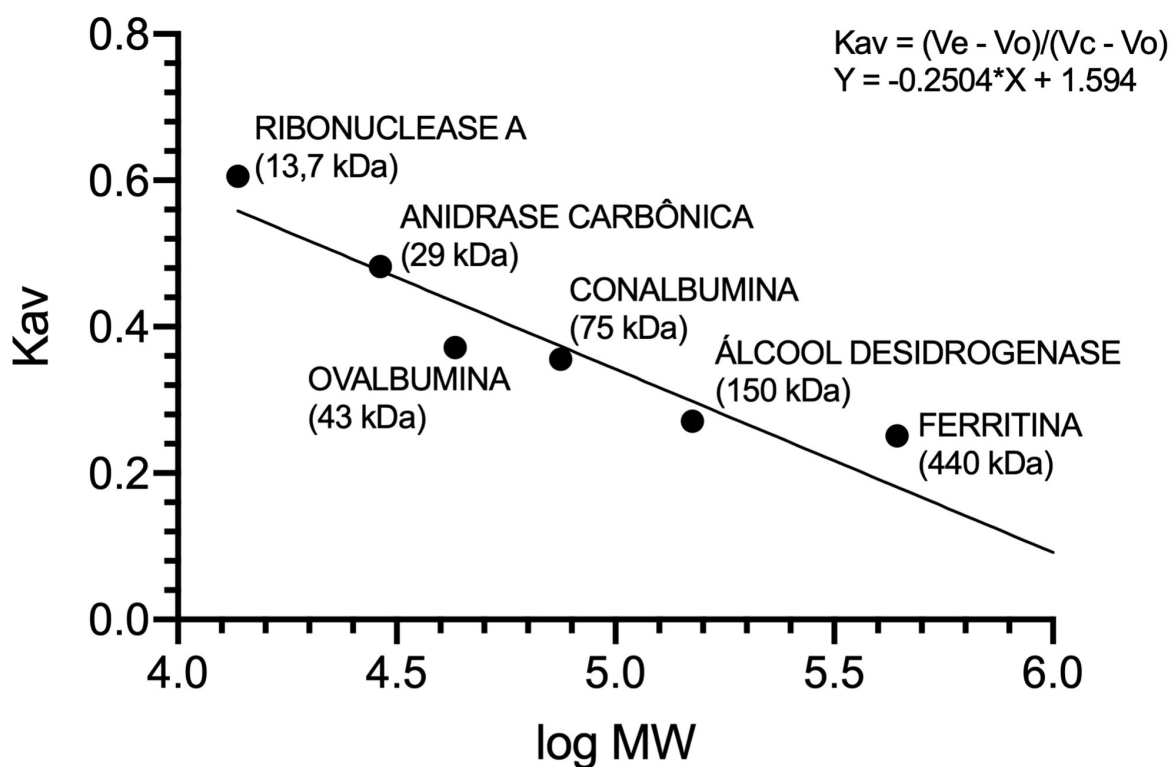


Figura 25. Curva de calibração para gel filtração. Os volumes de eluição das proteínas padrões são transformados em K_{av} para a coluna Superdex™ 200 10/300 GL (volume vazio 7,54 ml, volume total 24 ml). Isso é plotado em relação à função logarítmica da massa molecular conhecida.

Um pico característico que coincidia com o tamanho esperado do monômero sempre aparecia no mesmo volume de eluição (aproximadamente 13 mL) (Figura 26). Outro pico mais discreto que eluia entre 11 e 12 mL, apareceu em um dos testes. A fração correspondente a esse pico também foi avaliada por SDS-PAGE para tentar identificar um possível dímero, no entanto, não foi observado nenhuma banda com massa molecular esperada para o dímero.

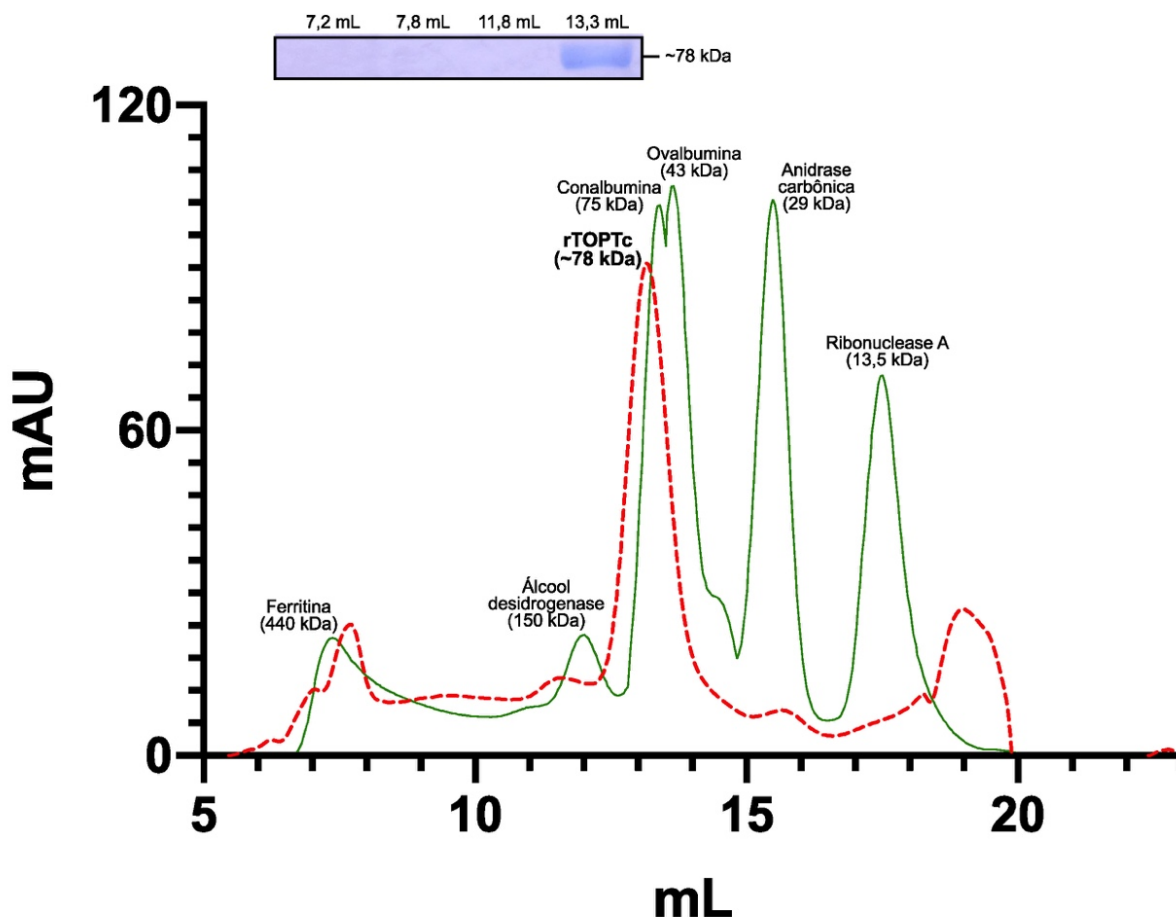


Figura 26. Cromatografia por exclusão de tamanho ou gel filtração feita utilizando a coluna Superdex™ 200 10/300 GL. Em verde temos uma mescla dos gráficos das misturas de calibração compostas por ferritina, álcool desidrogenase, ovalbumina, conalbumina, anidrase carbônica e ribonuclease A e em vermelho pontilhado temos a purificação da enzima recombinante thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (TOPTc).

5.9 TOPTC É CAPAZ DE CLIVAR PEPTÍDEOS HORMONAIS HUMANOS

Em busca de entender mais a fundo sobre o funcionamento da enzima, informações sobre a posição e especificidade da clivagem de diferentes substratos por essa protease foram obtidas da literatura. Para a maioria dos substratos relatados na literatura, o resíduo de aminoácido prolina aparece na posição P1, já na posição P1' aparece o aminoácido fenilalanina (Figura 27), indicando uma possível preferência de clivagem entre esses dois aminoácidos.

Specificity matrix								
Amino acid	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Gly	65	2	16	1	6	3	1	2
Pro	5	6	18	57	0	31	2	1
Ala	1	5	2	4	3	3	1	2
Val	1	1	4	1	0	3	2	0
Leu	0	2	3	6	1	5	10	0
Ile	0	2	1	0	4	5	3	3
Met	2	0	0	1	0	0	2	1
Phe	3	53	7	20	56	2	14	4
Tyr	1	3	0	2	2	3	4	1
Trp	0	0	0	0	1	0	0	0
Ser	2	3	56	2	20	4	2	1
Thr	0	1	2	0	1	0	1	4
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	11	1	1	3	2	1	2	4
Gln	1	3	4	1	2	2	68	5
Asp	3	1	1	4	2	1	1	1
Glu	1	1	1	1	1	1	4	2
Lys	2	14	2	2	3	2	0	0
Arg	5	7	3	17	19	55	5	9
His	1	2	2	2	1	3	0	1

Figura 27. Matriz de especificidade na posição dos resíduos de diferentes substratos clivados pela thimet oligopeptidase. Fonte: MEROPS.

Sabendo que as TOPs são conhecidas por clivar peptídeos hormonais (Orlowski et al., 1989; Serizawa; Dando; Barrett, 1995; Lew et al., 2004), procurou-se identificar quais seriam as especificidades de clivagem da rTOPTc frente a alguns peptídeos, foram eles: bradicinina, hormônio luteinizante e angiotensina I e angiotensina II. A especificidade da clivagem dos diferentes peptídeos foi analisada por espectrometria de massas.

A bradicinina e a angiotensina I apresentaram um único sítio de clivagem, enquanto o hormônio luteinizante e a angiotensina II apresentaram dois sítios (Figura 28). Assim como indicado na matriz de especificidade na posição dos resíduos de diferentes substratos clivados pela thimet oligopeptidase (Figura 27), o aminoácido serina é um dos resíduos que preferencialmente aparecem na posição P1', algo que também foi observado no padrão de clivagem em dois dos quatro peptídeos hormonais testados contra a rTOPTc (Figura 28).

A clivagem das angiotensinas I e II liberou angiotensina 1-7 (DRVYIHP) (Figura 28B e D). Além disso, a angiotensina II sofreu clivagem parcial, visto que, a massa do peptídeo não digerido continuou sendo observada junto com frações digeridas (Figura 28D), a clivagem desse peptídeo gerou as angiotensinas 1-7, 1-5, 5-8 e 2-7 (Tabela 2). A bradicinina foi clivada entre os aminoácidos fenilalanina e serina, apresentando clivagem total assim como a angiotensina I (Figura 28B) e o hormônio luteinizante (Figura 28H).

Tabela 2. Especificidade da clivagem dos peptídeos hormonais pela rTOPTc

Peptídeos	Sequência do peptídeo	Massa extraída (Da)	Resíduos liberados na digestão	Massa monoisotópica calculada (Da)
Angiotensina I	DRVYIHPFHL	1295,68	DRVYIHP	898,4660
			FHL	415,2219
Angiotensina II	DRVYIHPF	1045,54	DRVYIHPF	1045,5344
			DRVYIHP	898,4660
			DRVYI	664,3544
			HPF	399,1906
			IHPF	512,2747
			RVYIHP	783,4391
Bradicinina	RPPGFSPFR	1059,56	RPPGF	572,3070
			SPFR	505,2648
Hormônio Luteinizante	pyrHWSYGLRPG-NH ₂	1181,57	pyrHWS	538,2050
			YGLRPG-NH ₂	660,3707
			GLRPG-NH ₂	497,3073
			YGL	351,1794
			WSY	454,1852
			pyrH	*

* massa não foi detectada no espectro

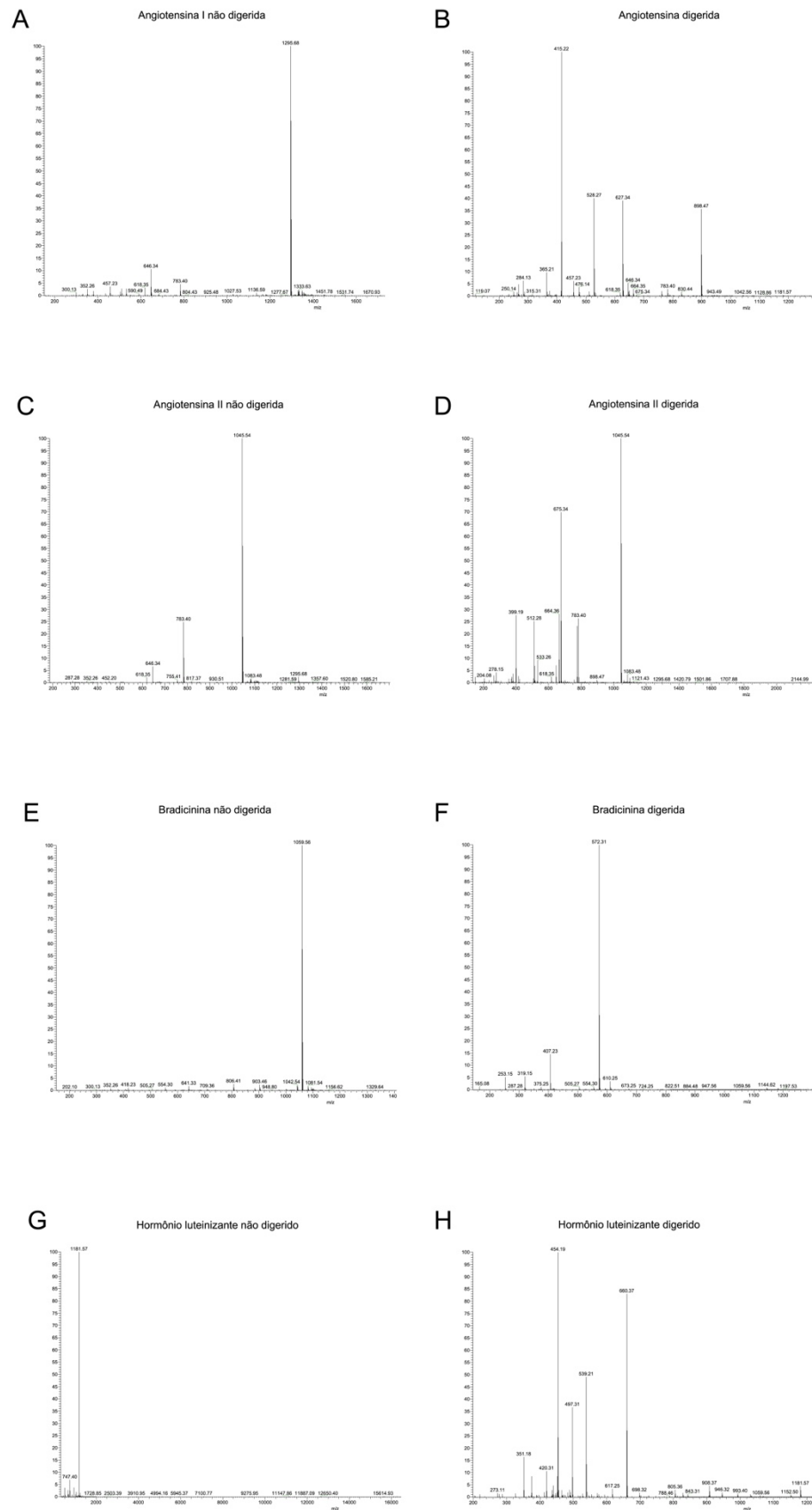


Figura 28. Clivagem de peptídeos hormonais pela TOPTc. Identificação dos peptídeos por espectrometria de massas.

5.10 PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS

Até o momento, não existe estrutura tridimensional resolvida experimentalmente da metaloprotease thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*, seja por cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear ou crio-microscopia eletrônica. Em busca de se obter o melhor modelo tridimensional possível, optou-se por trabalhar com quatro servidores diferentes para gerar esses modelos. Desses quatro, apenas um (I-TASSER) utilizava uma metodologia dependente de molde (Tabela 3).

Apesar do uso de diferentes servidores para a predição de estruturas, dentre os modelos gerados, selecionou-se apenas o modelo que apresentou a melhor pontuação de forma geral considerando diferentes métricas para a análise de qualidade do modelo (Tabela 3). O modelo escolhido para a utilização na triagem virtual foi o obtido pelo servidor AlphaFold (Q4D7D2).

Tabela 3. Análise da qualidade dos modelos preditos por diferentes servidores

Servidor	Metodologia	RMSD (Å)	MolProbity score	Clash score	pLDDT médio	ERRAT score
Alphafold (Q4D7D2)	Aprendizado profundo	1,023	1,03	1,75	94,58	96,89
Alphafold (Q4CVA3)	Aprendizado profundo	1,036	1,15	2,48	94,12	96,30
ColabFold	Aprendizado profundo	1,058	1,87	19,95	95,30	97,34
trRosetta	Aprendizado profundo	1,416	1,78	5,00	-	91,64
I-TASSER	Threading	0,786	3,00	9,11	-	94,54

5.11 INSPEÇÃO VISUAL DO MODELO

Ainda que apresentasse uma baixa identidade de sequência (~33%) com a thimet oligopeptidase humana, o modelo predito exibiu uma dobra semelhante, assim como a posição dos resíduos do sítio catalítico interagindo com o cofator (Figura 29). A TOPTc apresenta 11 resíduos de cisteína, sendo a menor distância entre eles de aproximadamente 7,5 Å, o que teoricamente impossibilita a formação de ligações dissulfeto intramoleculares. No entanto, isso não descarta a possibilidade da formação de dímeros e oligômeros através do processo de S-glutationilação, no qual resíduos de cisteína específicos são oxidados formando ligações dissulfeto intermoleculares e subsequente oligomerização (Demasi et al., 2008; Malvezzi et al., 2012).

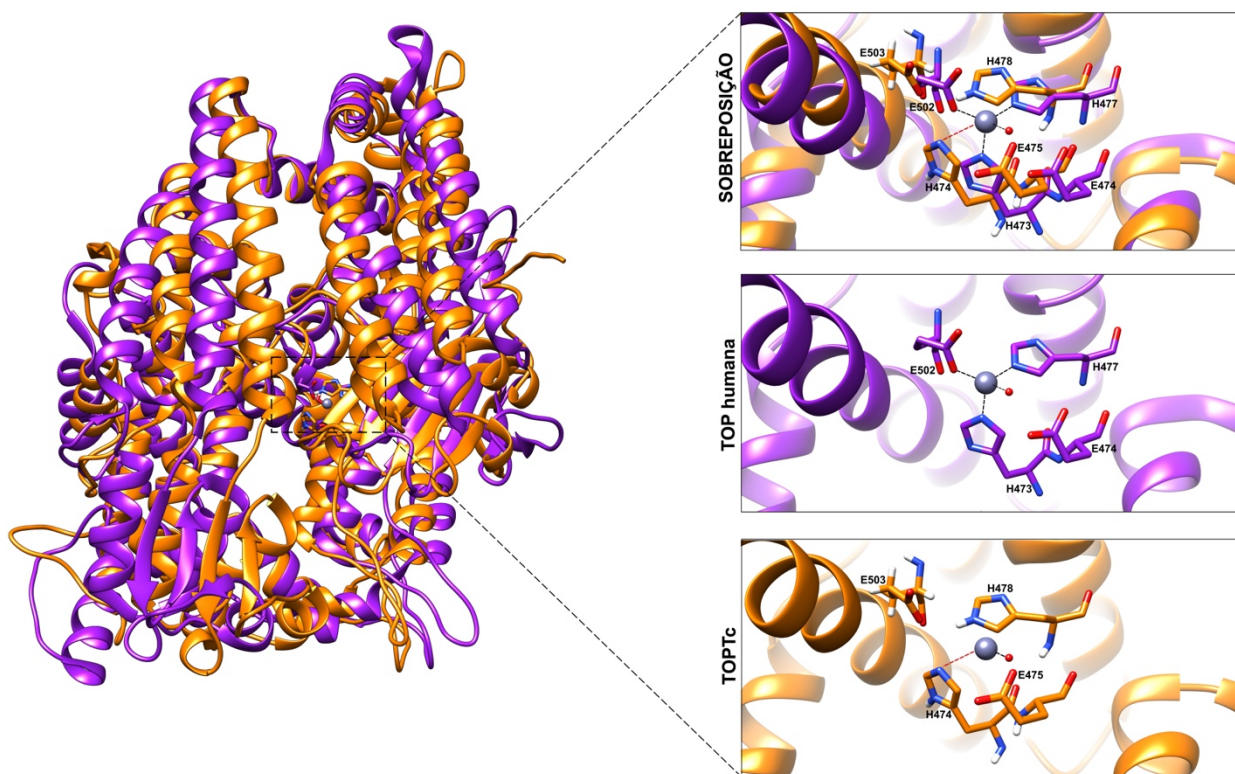
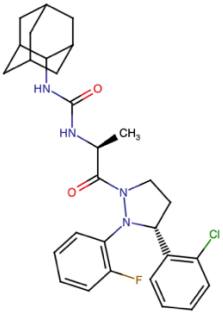
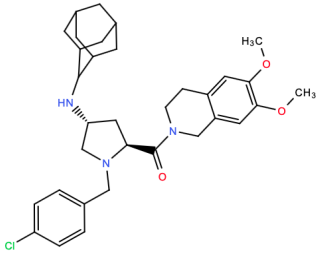
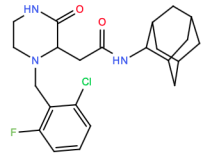
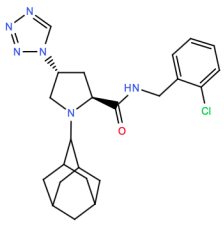
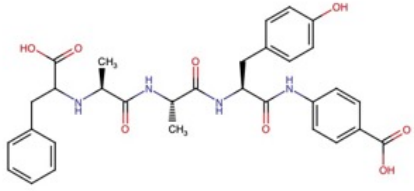
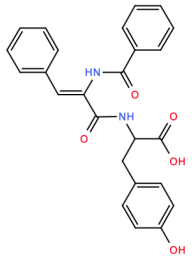
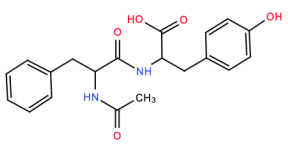
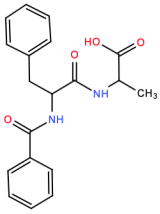


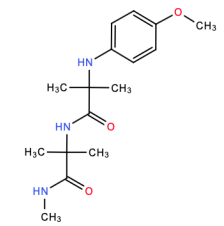
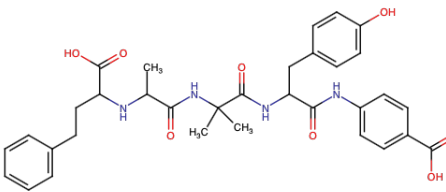
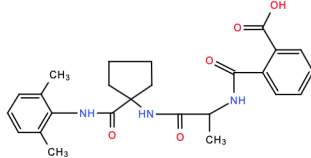
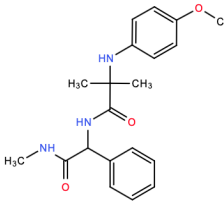
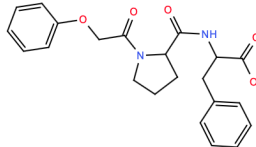
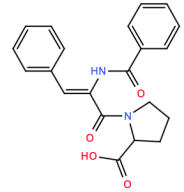
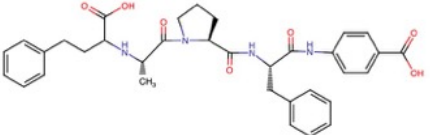
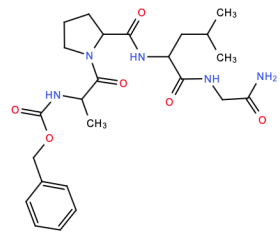
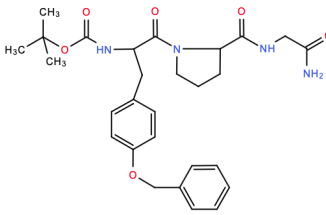
Figura 29. O modelo tridimensional predito da TOPTc (Q4D7D2) foi sobreposto com a estrutura tridimensional da TOP humana que está disponível no PDB sob o código 2O36. Os resíduos do sítio catalítico que fazem interação com o átomo de zinco (TOPTc: H474, E475, H478 e E503; TOP humana: H473, E474, H477 e E502) foram destacados.

5.12 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM *DOCKING* E TESTES *IN VITRO*

A triagem virtual foi baseada em *docking* molecular de acordo com a similaridade com inibidores já conhecidos (Tabela 4). Os inibidores R2, Cpp-Ala-Pro-Phe-pAb, Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb e JA-2 serviram de parâmetro de similaridade para a escolha da biblioteca de compostos utilizada na triagem virtual. O *docking score* dos compostos variou de -8,371 a -0,365. Dos *hits* selecionados, 13 compostos foram escolhidos para a realização dos testes *in vitro*. Uma primeira triagem desses compostos *in vitro* mostrou que cinco deles apresentaram mais de 50% de inibição (suas identificações estão destacadas em amarelo na Tabela 4) usando uma concentração de 100 μ M, sendo um deles com mais de 75%, nenhum deles correspondia ao melhor *docking score* observado na triagem virtual, a maioria apresentou *docking scores* semelhantes aos inibidores parâmetros, contudo, um deles apresentou um valor menor que o parâmetro referência (Figura 30A). No entanto, devido a instabilidade no armazenamento dos compostos não foi possível dar prosseguimento à caracterização da inibição, o que será realizado posteriormente, após aquisição de novas unidades dos compostos.

Tabela 4. Compostos provenientes da triagem virtual que foram selecionados para os testes *in vitro*

Inibidor base	Identificação do composto	Estrutura	Inibição da rTOPTc usando 100 μ M (%)
 R2	72450256		61,82
	83589794		54,51
	14632066		42,42
 cPP-Ala-Ala-Tyr-pAB	5252616		51,39
	6429601		33,67
	6428492		16,56

	61962035	 43,98
 JA2	5138754	 22,54
	24210801	 0,37
	7354299	 76,10
	5252615	 51,39
 Cpp-Ala-Pro-Phe-pAB	5217422	 20,15
	7648219	 -

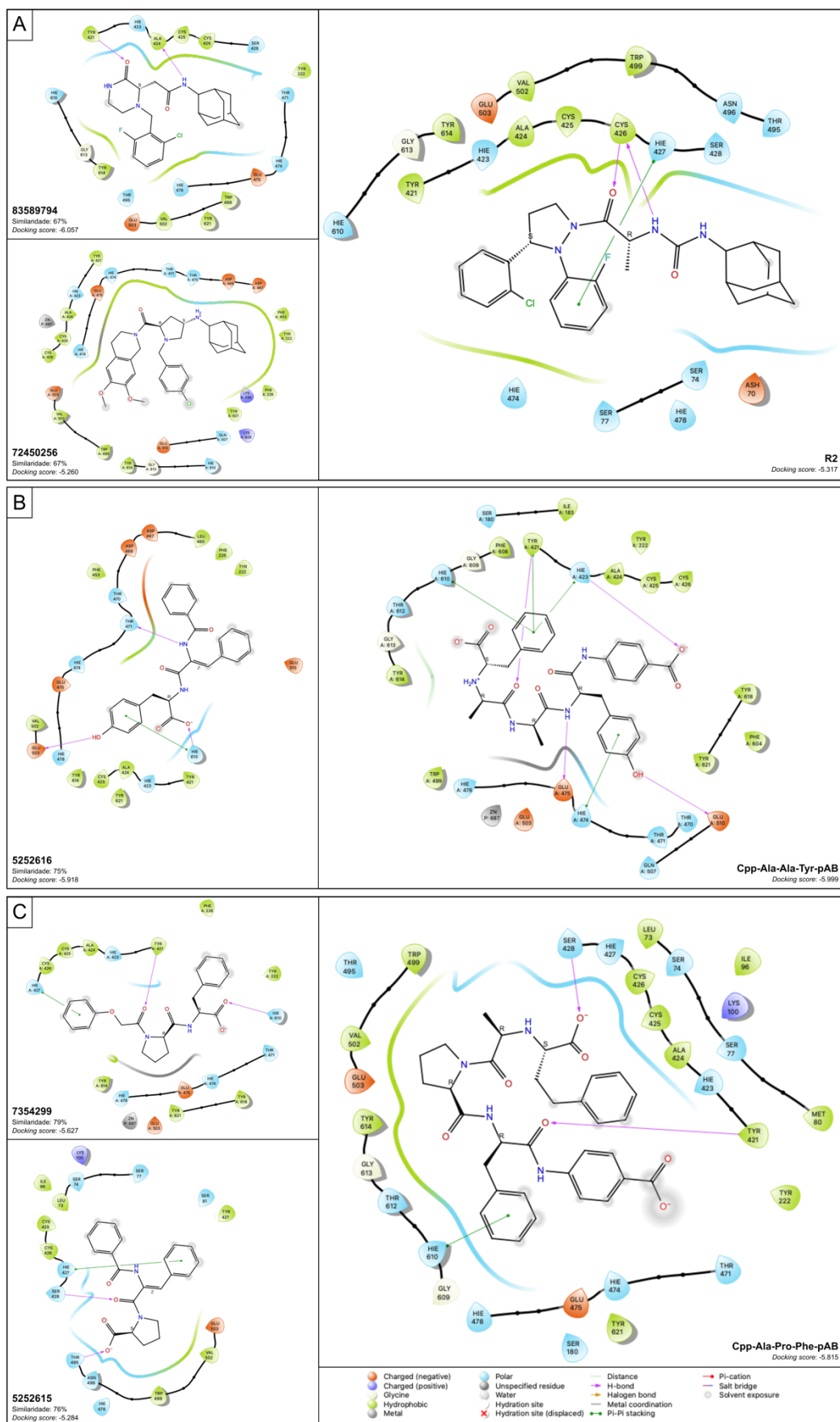


Figura 30. Poses e *docking scores* dos cinco melhores compostos da triagem *in vitro*. A) compostos que foram escolhidos com base na similaridade com o inibidor R2; B) com o inibidor Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAB; C) com o inibidor Cpp-Ala-Pro-Phe-pAB.

6 DISCUSSÃO

O sítio ativo da TOP é composto por uma sequência característico de metalopeptidases dependentes de zinco (HEXXH) e assim como em outras metaloproteases desse grupo, as duas histidinas (H474 e H478) pertencentes ao sítio catalítico são responsáveis por coordenar, juntamente com o glutamato na posição 503, o íon zinco que atua como cofator (Rawlings; Barrett, 1995). Acredita-se que o resíduo de glutamato do motivo de ligação (E475), assim como na thimet oligopeptidase humana, desempenhe um papel importante no mecanismo de reação, polarizando e orientando uma molécula de água coordenada por zinco que é o nucleófilo atacante (Kester; Matthews, 1977). Na thimet oligopeptidase humana, a molécula de água que coordena o zinco é bem definida pela densidade, e o glutamato do sítio é o incumbido de fazer as ligações de hidrogênio com a água (Ray et al., 2004). O sítio ativo, aparentemente, está contido em uma região da enzima que possui grande semelhança estrutural com as regiões do sítio ativo de outras metaloproteases do mesmo clã (MA), do qual fazem parte a neurolisina e termolisina (Matthews; Weaver; Kester, 1974).

El-Sayed et al. (2005) descreveram a cepa CL Brener como uma cepa híbrida que possui dois haplótipos, correspondentes a dois genomas ancestrais denominados *Esmeraldo-like* e *non-Esmeraldo-like*. Esta cepa apresenta alelos divergentes em muitos loci, além disso, a extrema flexibilidade do genoma no *T. cruzi* parece criar desafios com relação à preservação das funções essenciais do genoma e da expressão gênica que diferencia essa espécie dos cinetoplastídeos relacionados (Wang et al, 2021). A comparação da sequência de nucleotídeos do gene da TOP de *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener mostrou SNPs que foram responsáveis por produzir 18 alterações de aminoácidos (Figura 15). A vasta diversidade genética das linhagens de parasitas dessa espécie demonstra que SNPs e inserções/deleções (indels) são comuns a todos os genomas (Wang et al., 2021).

No que se refere a comparação da TOPTc com ortólogos de diversas espécies, os aminoácidos fenilalanina e histidina foram predominantes entre os 47 totalmente conservados, seguidos por tirosina, prolina, glicina, glutamato e aspartato, respectivamente. O número de resíduos totalmente conservados entre as sequências analisadas foi afetado pelo tamanho da sequência do protozoário *Angomonas deanei* (A0A7G2C850), fazendo com que 13 resíduos fossem desconsiderados como totalmente conservados, sendo considerados apenas como altamente conservados nesse caso.

A TOP humana possui 16 resíduos de cisteína, enquanto a de rato (*Rattus norvegicus*) e *T. cruzi* possuem 15 e 11, respectivamente. Os resíduos C246, C248 e C253 (posição relativa

aos resíduos em humano e rato) são considerados os resíduos de cisteína mais importantes para a oligomerização/inativação da TOP (Shrimpton et al., 1997; Icimoto et al., 2017). Nenhum dos indivíduos do cluster dos metazoários, com exceção do *Mus musculus*, ou do cluster dos protozoários apresentou conservação do resíduo de cisteína na posição equivalente a C246 em *Homo sapiens*, no entanto, o correspondente a C248 (*H. sapiens*) é conservado em todos os metazoários. O resíduo de cisteína na posição 253 (*H. sapiens*) não possui conservação alguma de aminoácido para essa posição em nenhum dos dois clusters. Substituições de cisteína por alanina e vice versa também foram observadas nas posições C425(*T. cruzi*)|A426(*H. sapiens*), A249 (*T. cruzi*)|A248 (*H. sapiens*) e C606 (*T. cruzi*)|A596 (*H. sapiens*), essas substituições por alanina também ocorreram na mesma posição para todos os outros metazoários analisados.

Fukasawa et al. 2011, afirmam que quase todas as metaloproteases contêm um ou dois íons de zinco, e várias enzimas contêm um ou dois íons de cobalto ou manganês. Estudos anteriores feitos com várias metaloproteases de zinco, por exemplo, astacina (Gomis-Rüth et al., 1994), carboxipeptidase A (Rosenberg et al., 1975) e termolisina (Monzingo et al., 1984; Bertini et al., 1979), tiveram o átomo de zinco substituído por outros cátions divalentes para investigar a função do metal na catálise e na estrutura. Algumas dessas enzimas demonstraram ter alta tolerância à substituição de metais por meio de estudos de substituição de metais (Hirose et al., 2001). No entanto, ainda é difícil determinar a relação entre a tolerância ao metal e a estrutura de coordenação do metal das metaloproteases de zinco (Fukasawa et al., 2011). No presente trabalho foi observado que a substituição do íon zinco por outros metais tornaram a TOPTc inativa, mostrando que, dentre os íons metálicos testados, a enzima apresenta dependência do zinco assim como observado para a TOP1 de *Arabidopsis thaliana* (Al-Mohanna et al., 2021).

Os resíduos de cisteína comumente desempenham papéis essenciais na estrutura e na função das proteínas, conferindo estabilidade por meio da formação de ligações dissulfeto. Para mais, os resíduos de cisteína são essenciais no processo de regulação redox através da sua oxidação em ácido sulfênico e posterior glutationilação (Demasi; Silva; Neto, 2003). As ligações intramoleculares normalmente são favorecidas em compartimentos extracelulares e de retículo endoplasmático, fornecendo suporte estrutural para a função e a localização nativas. Já as ligações intermoleculares mantêm a maturação e a localização adequadas por meio de interações intermoleculares proteína-proteína ou fornecendo um grupo tiol para reações com substratos moleculares (Morand et al., 2004). A perda dessas ligações pode causar a perda de estabilidade e eficácia (Guan, Zhang e Wypych, 2018), má orientação ou o mau funcionamento de receptores e transportadores (Tarnow et. al, 2003; Hänggi et al., 2006). Diferentemente dos

dissulfetos estruturais, os dissulfetos reversíveis geralmente têm papéis funcionais importantes e podem servir como interruptores redox (Sun et al., 2017).

Icimoto et al. (2017) demonstraram que ao contrário da oxidação produzida pelo envelhecimento associada à oligomerização e inibição da enzima, a oxidação por H_2O_2 produziu ácido sulfênico e manteve a TOP recombinante na forma monomérica. Neste trabalho foi observado que as amostras testadas com diferentes concentrações de H_2O_2 não demonstraram interferência no seu estado de oligomerização em comparação com o controle (Figura 18B), o que foi semelhante ao demonstrado anteriormente por Icimoto et al. (2017), no entanto, usando um menor espectro de concentrações testadas. A regulação da atividade da TOP está vinculada a uma concentração de H_2O_2 nas células funcionando através da formação de ácidos sulfínicos, sulfênicos e sulfônicos, além das ligações dissulfeto entre cadeias (Icimoto et al., 2017), podendo ser um motivo para a perda da atividade da rTOPTc na presença de H_2O_2 , embora não forme dímero inativo.

Cardoso (2022) trouxe dados sobre a termoestabilidade da TOPTc, mostrando que a enzima parece permanecer estável até 50 °C. Outro trabalho observou que a TOP e a neurolisina têm o ponto de virada de desnaturação induzida por temperatura e perda de atividade a 60 °C (Icimoto et al., 2020). Neste trabalho, constatou-se que a rTOPTc sofre desnaturação entre 50 °C e 60 °C, corroborando com o que foi descrito anteriormente. Apesar de não fazer parte da mesma família, de acordo com o sistema de classificação utilizado pelo banco de dados MEROPS, a forma como as proteases da família M3 se dobras se assemelha à da termolisina, o que pode ser um indício do motivo dessa termoestabilidade observada, visto que a forma como a proteína se dobra determina sua função (Alaei; Ashengroph; Moosavi-Movahedi, 2021).

A compreensão da estabilidade das proteínas é essencial em diversas etapas da pesquisa como a expressão, purificação, o armazenamento e os estudos estruturais no geral, para mais, também é um tópico de notável interesse para variados setores tais como farmacêutico, alimentício e o de biotecnologia (Deller; Kong; Rupp, 2016). Testes de estabilidade feitos anteriormente mostraram que a rTOPTc se mostrou instável quando armazenada em baixas temperaturas, independente de estar na presença de um aditivo anticongelante ou não (Cardoso, 2022). A enzima foi mais estável e ativa quando armazenada a 4 °C em comparação com o armazenamento a -20 °C, o teste foi realizado ao longo de 21 dias e a atividade da fração armazenada a 4 °C diminuiu sua atividade entre 25 a 30% após 3 semanas de testes. Duas outras condições de armazenamentos foram testadas no atual trabalho a fim de confirmar a preferência dessa enzima. O armazenamento da enzima a -80 °C na presença de glicerol (I) e a temperatura

ambiente (II) foram testadas ao longo de 21 dias. Os resultados obtidos reafirmaram a preferência do armazenamento da proteína a 4 °C, dado que apesar da condição I ter sido melhor que a II, a atividade ao longo dos 21 dias se manteve abaixo da observada para 4 °C.

Alguns parâmetros podem influenciar na estabilidade de uma proteína, como as reações redox que são de grande relevância para a TOPTc. Além do mais a presença da cauda de histidina na estrutura da proteína recombinante, que não está presente na estrutura da proteína selvagem, também pode causar uma mudança estrutural que desestabilize ou estabilize ainda mais a depender da temperatura em que a proteína se encontra (Cardoso, 2022).

Shrimpton et al. (2000) basearam um novo inibidor no Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb, reduzindo a ligação Ala-Tyr para torná-la resistente à neprilisina, o que diminuiu a potência do inibidor em mil vezes, contudo, a substituição desse mesmo resíduo de alanina por ácido alfa-aminoisobutírico (Aib) resultou em um composto, N-[1-(R,S)-carboxi-3-fenilpropil]-Ala-Aib-Tyr-p-aminobenzoato (JA-2), que era equipotente com Cpp-Ala-Ala-Tyr-pAb (Ki 23 nM) e estável *in vivo*. Assim como o composto inicial, o JA-2 também inibiu a neurolisina, mas de forma menos potente, todavia, não inibiu a peptidil-dipeptidase A, a enzima conversora de endotelina ou a neprilisina, sendo resistente à proteólise *in vivo* após a incorporação de beta aminoácidos (Smith et al., 2000).

Outros inibidores também foram descritos para a TOP como o N-[(2R,4R)-2-(2-hidroxifenil)-3-(3-mercaptopropionil)-4-tiazolidinecarbonil]-L-fenilalanina (SA898) (Ukai et al., 1996) e um inibidor misto alostérico atípico, 3-[(2S)-1-[(3R)-3-(2-clorofenil)-2-(2-fluorofenil)pirazolidina-1-il]-1-oxopropan-2-il]-1-(adamantan-2-il)ureia (também chamado de R2), que também inibe a neurolisina, possuindo atividade inibitória relativamente potente (valor pIC_{50} de $7,5 \pm 0,14$) e podendo ser usado para inibir essas enzimas *in vivo* e *in vitro* (Hines et al., 2014).

A determinação da afinidade dos inibidores e da posição de clivagem dos substratos de peptídeos baseia-se principalmente na interação P1'-S1' e é o principal determinante da afinidade dos inibidores e da posição de clivagem dos substratos de peptídeos (Gupta; Patil, 2012), por isso a importância de saber qual o resíduo e preferencialmente clivado em qual posição e qual resíduo possivelmente dificulta a clivagem naquele local específico.

Embora a participação da TOP na geração de angiotensina 1-7 tenha sido relatada pela primeira vez em células musculares lisas vasculares (Chappell et al., 1994), anteriormente ela já havia sido descrita atuando em outros neuropeptídeos (Orlowski; Michaud; Chu, 1983), ademais, outros estudos descobriram que essa enzima está amplamente distribuída em diferentes áreas do encéfalo, como cerebelo, hipocampo e córtex (Oliveira et al., 2001).

Como consequência de estruturas muito semelhantes e com alto grau de identidade de sequência, a TOP e a neurolisina clivam diversos peptídeos bioativos no mesmo local (Ray; Hines; Rodgers; 2002). No entanto, sabe-se que as duas enzimas clivam alguns peptídeos em posições diferentes, como é o caso da neurotensina, no qual a neurolisina cliva entre os resíduos de prolina (Pro10) e tirosina (Tyr11), já a TOP cliva entre dois resíduos de arginina (Arg8 e Arg9) (Lim et al., 2007). A compreensão dos determinantes dessa especificidade além de fornecer informações sobre o mecanismo de reconhecimento de sequência pela protease (Ray et al., 2004) também pode guiar em busca de diferenças entre a TOP humana e a TOPTc, assim como o desenvolvimento de futuros inibidores para ambas as proteases.

A bradicinina é clivada entre os resíduos fenilalanina (P1) e serina (P1'), mesma posição de clivagem realizada pela TOP humana (Knight; Dando; Barret, 1995), reforçando a especificidade da clivagem das TOPs em geral por esse sítio em bradicinina. A TOP é uma das principais enzimas envolvidas na produção de angiotensina 1-7 através da clivagem da angiotensina I (Pereira et al., 2013), essa mesma clivagem entre os resíduos de prolina (P1) e fenilalanina (P1') também acontece pela TOPTc. A clivagem de angiotensina II pela rTOPTc produziu não apenas angiotensina 1-7, mas também as angiotensinas 1-5, 5-8 e 2-7. A liberação desses peptídeos pode ter algum impacto no sistema renina-angiotensina do hospedeiro durante a infecção pelo *T. cruzi*, visto que a TOPTc também é secretada.

Existe uma grande lacuna entre a quantidade de sequências de proteínas conhecidas e estruturas determinadas experimentalmente (Varadi et al., 2023), no entanto, o desenvolvimento de ferramentas como o AlphaFold (Jumper et al., 2021), OpenFold (Ahdriz et al., 2024), RoseTTAFold (Baek et al., 2021), entre outras, demonstra uma precisão notável na predição de estruturas contribuindo com as pesquisas no campo da biologia estrutural, visto que os dados gerados por essas ferramentas fazem integração com vários recursos de banco de dados existentes como o PDB, UniProt, Ensembl, InterPro, Genecards, MobiDB, entre outros (Varadi et al., 2024). Embora o campo tenha feito avanços significativos, há lacunas perceptíveis tanto na representação de dados quanto na funcionalidade dessas ferramentas que precisam ser resolvidas, dentre elas temos o aprimoramento e atualização de dados, anotação de domínios e direcionamento de dados para estruturas multiméricas. Contudo, esforços em conjunto dos desenvolvedores dessas ferramentas e da comunidade científica através de comentários e experiências de uso vem sendo feitos a fim de aprimorar essas ferramentas (Varadi et al., 2024).

O procedimento mais comum para avaliar as sobreposições de estruturas é usar o RMSD, que também é uma das várias métricas propostas para quantificar a similaridade

evolutiva entre proteínas, bem como a qualidade dos alinhamentos de sequência (Jewett; Huang; Ferrin, 2003; Armougom et al., 2006). A principal desvantagem do RMSD reside no fato de que ele é dominado pelas amplitudes dos erros. Duas estruturas que são idênticas, com exceção de uma posição de um único loop ou de um terminal flexível, normalmente têm um grande RMSD de espinha dorsal global e não podem ser efetivamente sobrepostas por qualquer algoritmo que otimize o RMSD global (Kufareva; Abagyan, 2012). Aqui o RMSD das estruturas preditas foi calculado considerando a sobreposição com a TOP humana (PDB ID: 2O36), os valores variaram entre 0,786 Å e 1,416 Å, a diferença nos valores pode ser atribuída tanto ao método de predição quanto a possível flexibilidade do modelo interferindo na sobreposição.

A pontuação do pLDDT pode variar significativamente ao longo de uma cadeia protéica, isso significa que o AlphaFold2 pode estar muito confiante na estrutura de algumas partes da proteína, mas menos confiante em outras regiões permitindo que o usuário tenha uma indicação de quais partes da estrutura prevista podem ser confiáveis ou não (Guo et al., 2022). Considerando uma melhor forma de selecionar os modelos preditos, diferentes parâmetros foram utilizados em busca de transpor as desvantagens de cada uma das métricas. O modelo escolhido não apresentou os melhores parâmetros em todas as métricas analisadas, mas se sobressaiu aos outros modelos de forma geral.

Uma das vantagens da triagem virtual é que nem todos os compostos da biblioteca selecionada precisam ser testados, apenas os mais bem classificados. Contudo, a triagem virtual quando considerada como um método autônomo pode levar a muitos falsos positivos (Slater; Kontoyianni, 2019). A triagem virtual permitiu selecionar alguns possíveis “hits”, dos quais 13 foram selecionados para os testes *in vitro*, o *docking score* dos selecionados variou de -8,371 a -5,062. A confirmação experimental demonstrou que cinco deles apresentaram inibição acima de 50%, confirmando os ativos. Porém, os melhores compostos selecionados na triagem *in vitro* não correspondiam aos melhores *docking scores* observados, além disso, problemas no armazenamento desses compostos, devido a sua instabilidade, impediram a realização de outros testes, assim como o aprofundamento de qual seria a relação dessas substâncias com a TOPTc e como ocorre sua interação de fato. É válido ressaltar que nenhum dos métodos utilizados é superior ao outro e a sua integração é essencial para tirar o máximo proveito de seus pontos fortes e compensar seus problemas (Slater; Kontoyianni, 2019).

7 CONCLUSÃO

- O modelo tridimensional predito para a TOPTc apresenta grande similaridade estrutural com a thimet oligopeptidase humana que está disponível no PDB, especialmente na região do sítio catalítico na qual os resíduos apresentam boa sobreposição.
- O zinco é o metal de preferência para o seu bom funcionamento, não podendo ser substituído por outro metal sem perder sua atividade basal.
- A proteína possui temperatura de desnaturação superior à de proteases mesófilas, que é corroborada com a perda de sua atividade. O EDTA não inibe facilmente a enzima, mas pode ser usado como agente quelante desde que aumente a concentração utilizada.
- A exposição a agentes oxidantes, aparentemente, não promoveu dimerização por oxidação das ligações dissulfeto, sendo confirmado pelo padrão de expressão no gel de poliacrilamida em comparação com o controle.
- De acordo com a cromatografia por exclusão de tamanho a enzima recombinante, a princípio, é monomérica.
- A clivagem dos peptídeos hormonais pela TOPTc mostrou algumas particularidades e semelhanças com outras TOPs já estudadas e a geração de peptídeos de grande importância para o sistema renina-angiotensina.
- Cinco dos compostos testados *in vitro* apresentaram inibição significativa da enzima, mas devido a instabilidade no seu armazenamento novos testes precisam ser feitos para confirmar o observado.
- A integração de estratégias computacionais e experimentais se mostrou útil na identificação de possíveis compostos inibidores da TOPTc, porém, estudos precisam ser conduzidos a fim de continuar elucidando a importância e papel da Thimet oligopeptidase no *Trypanosoma cruzi* de forma a contribuir com as pesquisas na área de doenças tropicais negligenciadas.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão e secreção da enzima nas diferentes formas do parasito;
- Investigar a possível relação da TOPTc com processos fisiológicos ou patogênicos através de nocaute gênico;
- Buscar novos inibidores específicos para a TOPTc;
- Buscar substratos naturais da TOPTc;
- Realizar mutação sítio dirigida para avaliar a influência de diferentes resíduos na atividade e estrutura da protease.

9 REFERÊNCIAS

- ADASME, M. F.; LINNEMANN, K. L.; BOLZ, S. N.; KAISER, F.; SALENTIN, S.; HAUPT, V. J.; SCHROEDER, M. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Res.**, 49(1), 530-534, 2021. doi: 10.1093/nar/gkab294. PMID: 33950214; PMCID: PMC8262720.
- AHDRIITZ, G.; BOUATTA, N.; FLORISTEAN, C.; KADYAN, S.; XIA, Q.; GERECKE, W.; O'DONNELL, T. J.; BERENBERG, D.; FISK, I.; ZANICHELLI, N.; ZHANG, B.; NOWACZYNSKI, A.; WANG, B.; STEPNIIEWSKA-DZIUBINSKA, M. M.; ZHANG, S.; OJEWOLE, A.; GUNEY, M. E.; BIDERMAN, S.; WATKINS, A. M.; RA, S., ... ALQURAISHI, M. OpenFold: retraining AlphaFold2 yields new insights into its learning mechanisms and capacity for generalization. **Nature methods**, 21, 8, 1514–1524, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02272-z>.
- ALAEI, L.; ASHENGROPH, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The concept of protein folding/unfolding and its impacts on human health. **Advances in protein chemistry and structural biology**, 126, 227–278, 2021. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.007>.
- ALVAREZ, V. E.; IRIBARREN, P. A.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. Update on relevant trypanosome peptidases: Validated targets and future challenges. *Biochimica et biophysica acta*. **Proteins and proteomics**, 1869(2), 140577, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140577>.
- ALVES, M. S.; STREIT, L.; PIZZOLATO, T. M. UTILIZAÇÃO DE MODELOS *IN SILICO* PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS, FÁRMACOS E METABÓLITOS EM ÁGUAS NATURAIS. **Química Nova**, 46(9), 881–889, 2023. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230062>.
- ARMOUGOM, F.; MORETTI, S.; KEDUAS, V.; NOTREDAME, C. The iRMSD: a local measure of sequence alignment accuracy using structural information. **Bioinformatics**, 22, 14, 35-39, 2006. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl218>
- AVARIA, A.; VENTURA-GARCIA, L.; SANMARTINO, M.; VAN DER LAAT, C. Population movements, borders, and Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 117, 210151, 2022. doi: 10.1590/0074-02760210151. PMID: 35830004; PMCID: PMC9273182.
- BAEK, M.; DIMAIO, F.; ANISHCHENKO, I.; DAUPARAS, J.; OVCHINNIKOV, S.; LEE, G. R.; WANG, J.; CONG, Q.; KINCH, L. N.; SCHAEFFER, R. D.; MILLÁN, C.; PARK, H.; ADAMS, C.; GLASSMAN, C. R.; DEGIOVANNI, A.; PEREIRA, J. H.; RODRIGUES, A. V.; VAN DIJK, A. A.; EBRECHT, A. C.; OPPERMAN, D. J.; ... BAKER, D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, 373, 6557, 871–876, 2021. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>.
- BARRETT, A. J.; BROWN, M. A.; DANDO, P. M.; KNIGHT, C. G.; MCKIE, N., RAWLINGS, N. D.; SERIZAWA, A. Thimet oligopeptidase and oligopeptidase M or neurolysin. **Methods Enzymol.**, 1995, 248, 529-556. doi: 10.1016/0076-6879(95)48034-x.
- BARRETT, A. J.; CHEN, J. M. Thimet Oligopeptidase. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, 504–509, 2013. doi:10.1016/b978-0-12-382219-2.00101-0.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. 2004. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Londres: Academic Press, 2004.

BASTOS, I. M.; MOTTA, F. N.; GRELLIER, P.; SANTANA, J. M. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for Chagas disease, leishmaniasis and African trypanosomiasis. **Current medicinal chemistry**, 20(25), 3103–3115, 2013. <https://doi.org/10.2174/0929867311320250006>

BECK, B. R.; SHIN, B.; CHOI, Y.; PARK, S.; KANG, K. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. **Computational and structural biotechnology journal**, 18, 784–790, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.025>.

BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med.**, 373(5), 456-466, 2015. doi: 10.1056/NEJMr1410150. PMID: 26222561.

BERNSEN, C. **Analysis of protein structure using Molprobit V.3**. Protocols.io, 2021. Disponível em: <https://www.protocols.io/view/analysis-of-protein-structure-using-molprobit-rm7vz8998vx1/v3?step=6.2>. Acesso em 13 ago. 2024.

BERTI, D.A.; MORANO, C.; RUSSO, L.C.; CASTRO, L.M.; CUNHA, F.M.; ZHANG, X.; SIRONI, J.; KLITZKE, C.F.; FERRO, E.S.; FRICKER, L.D. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. **J. Biol. Chem.**, 284, 14105–14116, 2009.

BERTINI, I.; CANTI, G.; KOZLOWSKI, H.; SCOZZAFAVA, A. Spectroscopic characterization of copper(II) thermolysin. **Journal of the Chemical Society Dalton Transactions**, 8, 1270–1273, 1979.

BIERMAN, W. F.; VAN AGTMAEL, M. A.; NIJHUIS, M.; DANNER, S. A.; BOUCHER, C. A. HIV monotherapy with ritonavir-boosted protease inhibitors: a systematic review. **AIDS**, 23(3), 279–291, 2009. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32831c54e5>

BRASIL. “**Agir agora. Agir juntos. Investir em DTNs**”: 30/01 – Dia Mundial das Doenças Tropicais Negligenciadas. Biblioteca Virtual em Saúde (Ministério da Saúde), 2023. Disponível em: <https://bvsm.sau.de.gov.br/agir-agora-agir-juntos-investir-em-dtns-30-01-dia-mundial-das-doencas-tropicais-negligenciadas/#:~:text=%20As%20doen%20as%20negligenciadas%20atingem%20popula%20esfor%20pol%20ADtico%20Decon%20conjunto>. Acesso em: 13 jun. 2024.

BRASIL. **Doenças socialmente determinadas: saiba mais sobre a Doença de Chagas**. Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/junho/doencas-socialmente-determinadas-saiba-mais-sobre-a-doenca-de-chagas> 11 set. 2024.

BRUNETO, E. G.; FERNANDES-SILVA, M. M.; TOLEDO-CORNELL, C.; MARTINS, S.; FERREIRA, J. M. B.; CORRÊA, V. R.; DA COSTA, J. M.; PINTO, A. Y. D. N.; DE SOUZA, D. D. S. M.; PINTO, M. C. G.; NETO, J. A. F.; RAMOS, A. N.; MAGUIRE, J. H.; SILVESTRE, O. M. Case-fatality From Orally-transmitted Acute Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clin Infect Dis.** 72(6), 1084-1092, 2021. doi: 10.1093/cid/ciaa1148. PMID: 32772104.

BUEL, G.; WALTERS, K. Can AlphaFold2 predict the impact of missense mutations on structure? **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 29, 1–2, 2022. doi:10.1038/s41594-021-00714-2.

CAMARGO, A. C. M. Distinction between endo-oligopeptidase A (EC 3.4.22.19) and soluble metalloendopeptidase (EC 3.4.24.15). **Biochem. J.**, 277, 294-295, 1991.

CAMPOS, T. C. Doenças negligenciadas, pobreza e exclusão social: mera coincidência geográfica? **Revista da Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo**, 103, 793-830, 2008.

CARDOSO, I.C.C. **Caracterização bioquímica e análise estrutural *in silico* de thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi***. 2022. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

CARDOZO, C.; ORLOWSKI, M. Evidence that enzymatic conversion of N-[1(R,S)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Ala-Phe-p-aminobenzoate, a specific inhibitor of endopeptidase 24.15, to N-[1(R,S)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Ala is necessary for inhibition of angiotensin converting enzyme. **Peptides**, 14, 1259–1262, 1993.

CARR, A.; AMIN, J. Efficacy and tolerability of initial antiretroviral therapy: a systematic review. **AIDS**, 23(3), 343-353, 2009. doi: 10.1097/QAD.0b013e32831db232.

CARVALHO, A. A.; LIMA, K. S.; MESQUITA, A. O. D. Paxlovid: desenvolvimento, farmacologia e implicações para a prática farmacêutica. **Research, Society and Development**, 12, 5, 2023. doi: 10.33448/rsd-v12i5.41699.

CHANG, Y.; HAWKINS, B. A.; DU, J. J.; GROUNDWATER, P. W.; HIBBS, D. E.; LAI, F. A Guide to *In Silico* Drug Design. **Pharmaceutics**, 15(1), 49, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics15010049. PMID: 36678678; PMCID: PMC9867171.

CHAPPELL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Conversion of angiotensinI to angiotensin (1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells. **J Vasc Med Biol.**, 5, 129–137, 1994.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, 66, 12–21, 2010. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **Int J Biochem Cell Biol.**, 35(6), 769-73, 2003. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00309-6. PMID: 12676162.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of non-bonded atomic interactions. **Protein Sci.**, 2, 1511–1519. 1993.

COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitology**, 114, 61–80, 1997.

COSTA, E. G.; DOS SANTOS, S. O.; SOJO-MILANO, M.; AMADOR, E. C.; TATTO, E.; SOUZA, D. S. A.; COSTA, F.; PÓVOA, R. M. Acute Chagas Disease in the Brazilian

Amazon: Epidemiological and clinical features. **Int J Cardiol.**, 235, 176-178, 2017. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.02.101. PMID: 28268086.

CUNHA, L.; ALVES, L.; SANTANA, L.; NUNES, G.; ROLIM NETO, P. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de Chagas e Leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**, 40, 2011. 10.5216/rpt.v40i2.14936.

DANDO, P.M.; BROWN, M.A.; BARRETT, A.J. Human thimet oligopeptidase. **Biochem. J.** 294, 451-457, 1993.

DE SOUZA, W.; BARRIAS, E. S. May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? **Acta Trop.**, 212, 105688, 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105688. PMID: 32888934.

DELLER, M. C.; KONG, L.; RUPP, B. Protein stability: a crystallographer's perspective. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications**, 72, 72–95, 2016. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15024619>.

DEMASI, M.; PIASSA FILHO, G. M.; CASTRO, L. M.; FERREIRA, J. C.; RIOLI, V.; FERRO, E. S. Oligomerization of the cysteinyl-rich oligopeptidase EP24. 15 is triggered by S-glutathionylation. **Free Radic Biol Med.**, 44, 1180– 1190, 2008.

DEMASI, M.; SILVA, G. M.; NETTO, L. E. S. 20 s proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. **J. Biol. Chem.**, 278:679–685; 2003.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, 309, 409-415, 2005. doi: 10.1126/science.1112631. PMID: 16020725.

FERNANDO, D. D.; FISCHER, K. Proteases and pseudoproteases in parasitic arthropods of clinical importance. **The FEBS journal**, 287(19), 4284–4299, 2020. <https://doi.org/10.1111/febs.15546>.

FERREIRA, A. Z. L.; ARAÚJO, C. N.; CARDOSO, I. C. C.; MANGABEIRA, K. S. S.; ROCHA, A. P.; CHARNEAU, S.; SANTANA, J. M.; MOTTA, F. N.; BASTOS, I. M. D.

Metacyclogenesis as the Starting Point of Chagas Disease. **Int J Mol Sci.**, 25(1), 117, 2023. doi: 10.3390/ijms25010117. PMID: 38203289; PMCID: PMC10778605.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, 2(4), 4-11, 2014.

FERRO, E. S.; GEWEHR, M. C. F.; NAVON, A. Thimet Oligopeptidase Biochemical and Biological Significances: Past, Present, and Future Directions. **Biomolecules**, 10(9), 1229, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10091229>.

FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas: Fisiologia**. 2017. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/vetor/fisiologia/>. Acesso em 14 jun. 2024.

FRÖHLICH, E.; SALAR-BEHZADI, S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies. **Int J Mol Sci.**, 15(3), 4795-822, 2014. doi: 10.3390/ijms15034795. PMID: 24646916; PMCID: PMC3975425.

FUKASAWA, K. M.; HATA, T.; ONO, Y.; HIROSE, J. Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. **J Amino Acids**, 574816, 2011. doi: 10.4061/2011/574816. PMID: 22312463; PMCID: PMC3268031.

GIMENO, A.; OJEDA-MONTES, M. J.; TOMÁS-HERNÁNDEZ, S.; CERETO-MASSAGUÉ, A.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; MULERO, M.; PUJADAS, G.; GARCIA-VALLVÉ, S. The Light and Dark Sides of Virtual Screening: What Is There to Know? **Int J Mol Sci.**, 20(6), 1375, 2019. doi:10.3390/ijms20061375

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev.**, 82, 373–428, 2002.

GOMIS-RÜTH, F. X.; GRAMS, F.; YIALLOUROS, I.; NAR, H.; KÜSTHARDT, U.; ZWILLING, R.; BODE, W.; STÖCKER, W. Crystal structures, spectroscopic features, and catalytic properties of cobalt(II), copper(II), nickel(II), and mercury(II) derivatives of the zinc endopeptidase astacin. A correlation of structure and proteolytic activity. **Journal of Biological Chemistry**, 269(25), 17111–17117, 1994.

GONÇALVES, C.S.; ÁVILA, A.R.; DE 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.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R.; SCHRÉVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, 276(50), 47078-47086, 2001. doi:10.1074/jbc.M106017200

GUAN, X.; ZHANG, L.; WYPYCH, J. Direct mass spectrometric characterization of disulfide linkages. **MAbs.**, 572-582, 2018. doi: 10.1080/19420862.2018.1442998. PMID: 29469657; PMCID: PMC5973703.

GUPTA, S. P.; PATIL, V. M. Specificity of binding with matrix metalloproteinases. **Exp Suppl.**, 103, 35-56, 2012. doi: 10.1007/978-3-0348-0364-9_2. PMID: 22642189.

- HAMBROOK, J. R.; KABORÉ, A. L.; PILA, E. A.; HANINGTON, P. C. A metalloprotease produced by larval *Schistosoma mansoni* facilitates infection establishment and maintenance in the snail host by interfering with immune cell function. **PLoS pathogens**, 14(10), e1007393, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007393>
- HÄNGGI, E.; GRUNDSCHÖBER, A. F.; LEUTHOLD, S.; MEIER, P. J.; ST-PIERRE, M. V. Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. **Mol. Pharmacol.**, 70, 806–817, 2006.
- HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annu Rev Biochem.**, 29, 45-72, 1960. doi: 10.1146/annurev.bi.29.070160.000401. PMID: 14400122.
- HÄSE, C. C.; FINKELSTEIN, R. A. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. **Microbiol Rev.**, 57(4), 823-837, 1993. doi: 10.1128/mr.57.4.823-837.1993. PMID: 8302217; PMCID: PMC372940.
- HAYASHI, M.A.; GUERREIRO, J.R.; CHARYCH, E.; KAMIYA, A.; BARBOSA, R.L.; MACHADO, M.F.; CAMPEIRO, J.D.; OLIVEIRA, V.; SAWA, A.; CAMARGO, A.C.; BRANDON, N.J. Assessing the role of endo-oligopeptidase activity of Ndel1 (nuclear-distribution gene E homolog like-1) in neurite outgrowth. **Mol. Cell Neurosci.**, 44(4), 353-361, 2010.
- HINES, C. S.; RAY, K.; SCHMIDT, J. J.; XIONG, F.; FEENSTRA, R. W.; PRAS-RAVES, M.; DE MOES, J. P.; LANGE, J. H.; MELIKISHVILI, M.; FRIED, M. G.; MORTENSON, P.; CHARLTON, M.; PATEL, Y.; COURTNEY, S. M.; KRUSE, C. G.; RODGERS, D. W. Allosteric inhibition of the neuropeptidase neurolysin. **J. Biol. Chem.**, 289, 35605–35619, 2014.
- HIROSE, J.; IWAMOTO, H.; NAGAO, I.; ENMYO, K.; SUGAO, H.; KANEMITU, N.; IKEDA, K.; TAKEDA M.; INOUE, M.; IKEDA, T.; MATSUURA, F.; FUKASAWA, K. M.; FUKASAWA, K. Characterization of the metal-substituted dipeptidyl peptidase III (rat liver). **Biochemistry**, 40(39), 11860–11865, 2001.
- HOK, H. Y. S.; BOLSEWIG, K.; RUITERS, D. N.; LLEÓ, A.; ALCOLEA, D.; LEMSTRA, A. W.; VAN, F. W. M.; CAMPO, M.; TEUNISSEN, C. E. Thimet Oligopeptidase is a potential CSF biomarker for Alzheimer's Disease. **Alzheimer's Dement**, 18, e065528, 2022. <https://doi.org/10.1002/alz.065528>.
- HOOPER, N. Families of zinc metalloproteases. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, 354, 182-191, 1994.
- ICIMOTO, M. Y.; BRITO, A. M. M.; RAMOS, M. P. C.; OLIVEIRA, V.; NANTES-CARDOSO, I. L. Increased Stability of Oligopeptidases Immobilized on Gold Nanoparticles. **Catalysts**, 10, 78, 2020. <https://doi.org/10.3390/catal10010078>
- ICIMOTO, M. Y.; FERREIRA, J. C.; YOKOMIZO, C. H.; BIM, L.; MAREM, A.; GILIO, J. M.; OLIVEIRA, V.; NANTES, I. L. Redox modulation of thimet oligopeptidase activity by hydrogen peroxide. **FEBS Open Bio**, 7(7), 1037–1050, 2017. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12245>.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites Vectors**, 11, 502, 2018.

JEWETT, A. I.; HUANG, C. C.; FERRIN, T. E. MINRMS: an efficient algorithm for determining protein structure similarity using root-mean-squared-distance. **Bioinformatics**, 19, 5, 625–634, 2003. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg035>.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S. A. A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, 596(7873), 583-589, 2021.

KE, Y. Y.; PENG, T. T.; YEH, T. K.; HUANG, W. Z.; CHANG, S. E.; WU, S. H.; HUNG, H. C.; HSU, T. A.; LEE, S. J.; SONG, J. S.; LIN, W. H.; CHIANG, T. J.; LIN, J. H.; SYTWU, H. K.; CHEN, C. T. Artificial intelligence approach fighting COVID-19 with repurposing drugs. **Biomedical journal**, 43(4), 355–362, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.05.001>

KESSLER, R. L.; CONTRERAS, V. T.; MARLIÈRE, N. P.; APARECIDA GUARNERI, A.; VILLAMIZAR SILVA, L. H.; MAZZAROTTO, G. A. C. A.; BATISTA, M.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, M. A.; PROBST, C. M. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Mol Microbiol.**, 104(5), 712-736, 2017. doi: 10.1111/mmi.13653. PMID: 28240790.

KESTER, W. R.; MATTHEWS, B. W. Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the mechanism of catalysis. **Biochemistry**, 16(11), 2506-2516, 1977. doi: 10.1021/bi00630a030. PMID: 861218.

KNIGHT, C.G.; BARRETT, A.J. Structure/function relationships in the inhibition of thimet oligopeptidase by carboxyphenylpropyl-peptides. **FEBS Lett.**, 294, 183-186, 1991.

KNIGHT, C.G.; DANDO, P.M.; BARRETT, A.J. Thimet oligopeptidase specificity: evidence of preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of peptide hydrolysis. **Biochem. J.**, 308, 145-150, 1995.

KOIKE, H.; SEKI, H.; KOUCHI, Z.; ITO, M.; KINOUCHI, T.; TOMIOKA, S.; SORIMACHI, H.; SAIDO, T. C.; MARUYAMA, K.; SUZUKI, K.; ISHIURA, S. Thimet oligopeptidase cleaves the full-length Alzheimer amyloid precursor protein at a beta-secretase cleavage site in COS cells. **J Biochem.**, 126(1), 235-42, 1999. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022428. PMID: 10393344.

KOWALEWSKI, J.; RAY, A. Predicting novel drugs for SARS-CoV-2 using machine learning from a >10 million chemical space. **Heliyon**, 6(8), e04639, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04639>.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in molecular biology**, 857, 231–257, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10.

LENART, A.; DUDKIEWICZ, M.; GRYNBERG, M.; PAWŁOWSKI, K. CLCAs - a family of metalloproteases of intriguing phylogenetic distribution and with cases of substituted catalytic sites. **PloS one**, 8(5), e62272, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062272>.

LESLEY, S. M.; ADRIAN, R. P. Thimet oligopeptidase expression is differentially regulated in neuroendocrine and spermatid cell lines by transcription factor binding to SRY (sex-determining region Y), CAAT and CREB (cAMP-response-element-binding protein) promoter consensus sequences. **Biochem J.**, 376, 189–197, 2003.

LEW, R. A. The zinc metallopeptidase family: new faces, new functions. **Protein Pept Lett.**, 11(5), 407–414, 2004. doi: 10.2174/0929866043406481. PMID: 15544561.

LEW, R. A.; BOULOS, E.; STEWART, K. M.; PERLMUTTER, P.; HARTE, M. F.; BOND, S.; AGUILAR, M. I.; SMITH, A. I. Bradykinin analogues with beta-amino acid substitutions reveal subtle differences in substrate specificity between the endopeptidases EC 3.4.24.15 and EC 3.4.24.16. **J. Pept. Sci.**, 6, 440–445, 2000.

LEW, R. A.; TETAZ, T. J.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L.; SMITH, A. I. Evidence for a two-step mechanism of gonadotropin-releasing hormone metabolism by prolyl endopeptidase and metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 in ovine hypothalamic extracts. **The Journal of biological chemistry**, 269(17), 12626–12632, 1994.

LIM, E. J.; SAMPATH, S.; COLL-RODRIGUEZ, J.; SCHMIDT, J.; RAY, K.; RODGERS, D. W. Swapping the substrate specificities of the neuropeptidases neurolysin and thimet oligopeptidase. **The Journal of biological chemistry**, 282(13), 9722–9732, 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609897200>.

LIU, H.; ZHAO, H. Prognosis related miRNAs, DNA methylation, and epigenetic interactions in lung adenocarcinoma. **Neoplasma**, 66(3), 487–493, 2019.

LIU, K.; WATANABE, E.; KOKUBO, H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations. **Journal of computer-aided molecular design**, 31, 2, 201–211, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-0005-2>.

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature reviews*. **Molecular cell biology**, 3(7), 509–519, 2002. <https://doi.org/10.1038/nrm858>

LU, S.; WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; YANG, M.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; LANCZYCKI, C. J.; MARCHLER-BAUER, A. CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Res.**, 48, 265–268, 2020.

MAÇANEIRO, L. O. F. **Expressão de imunoproteassoma em células infectadas com *Trypanosoma cruzi***. [Tese]. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília, 2008.

MACHADO, M. O. **Análise do secretoma/excretoma da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi***. [Dissertação]. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília, 2013.

MALVEZZI, A.; HIGA, P. M.; AMARAL, A. T.; SILVA, G. M.; GOZZO, F. C.; FERRO, E. S.; CASTRO, L. M.; REZENDE, L.; MONTEIRO, G.; DEMASI, M. The cysteine-rich protein thimet oligopeptidase as a model of the structural requirements for S-glutathiolation and oxidative oligomerization. **PLoS ONE**, 7, e39408, 2012.

MANDACARU, S. C.; QUEIROZ, R. M. L.; ALBORGHETTI, M. R.; DE OLIVEIRA, L. S.; DE LIMA, C. M. R.; BASTOS, I. M. D.; SANTANA, J. M.; ROEPSTORFF, P.; RICART, C.

A. O.; CHARNEAU, S. Exoproteome profiling of *Trypanosoma cruzi* during amastigogenesis early stages. **PLoS ONE**, 14(11), 1–18, 2019.

MARCHLER-BAUER, A.; BO, Y.; HAN, L.; HE, J.; LANCZYCKI, C. J.; LU, S.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Res.**, 45, 200–203, 2017.

MARIANI, V.; BIASINI, M.; BARBATO, A.; SCHWEDE, T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests, **Bioinformatics**, 29, 21, 2722–2728, 2013.

MATKAWALA, F.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World J Microbiol Biotechnol.**, 37(4), 63, 2021. doi: 10.1007/s11274-021-03036-z. PMID: 33730214.

MATTHEWS, B. W.; WEAVER, L. H.; KESTER, W. R. The conformation of thermolysin. **J Biol Chem.**, 249(24), 8030–8044, 1974. PMID: 4214815.

MCKAY, S.; SHU'AIBU, J.; Cissé, A.; KNIGHT, A.; ABDULLAHI, F.; IBRAHIM, A.; MADAKI, S.; GENOVEZOS, C.; MCCOY, K.; DOWNS, P.; KABORE, A.; ADAMU, H.; GOBIR, I. B.; CHAITKIN, M.; STANDLEY, C. J. Safely resuming neglected tropical disease control activities during COVID-19: Perspectives from Nigeria and Guinea. **PLoS Negl Trop Dis.**, 15(12), 2021. doi:10.1371/journal.pntd.0009904

GUO, H. B.; PERMINOV, A.; BEKELE, S. ET AL. AlphaFold2 models indicate that protein sequence determines both structure and dynamics. **Sci Rep.**, 12, 10696, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14382-9>.

MEDINA-RINCÓN, G. J.; GALLO-BERNAL, S.; JIMÉNEZ, P. A.; CRUZ-SAAVEDRA, L.; RAMÍREZ, J. D.; RODRÍGUEZ, M. J.; MEDINA-MUR, R.; DÍAZ-NASSIF, G.; VALDERRAMA-ACHURY, M. D.; MEDINA, H. M. Molecular and Clinical Aspects of Chronic Manifestations in Chagas Disease: A State-of-the-Art Review. **Pathogens**, 10(11), 1493, 2021. doi:10.3390/pathogens10111493

MEROPS. **Families of Proteolytic Enzymes**. 2017. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/merops/about/classification.shtml#FAM>. Acesso em 26 maio 2024.

MONTIEL, J.L.; CORNILLE, F.; ROQUES, B.P.; NOBLE, F. Nociceptin/orphanin FQ metabolism: Role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. **J. Neurochem.**, 68, 354–361, 1997.

MONZINGO, A. F.; MATTHEWS, B. W. Binding of N-carboxymethyl dipeptide inhibitors to thermolysin determined by X-ray crystallography: a novel class of transition-state analogues for zinc peptidases. **Biochemistry**, 23(24), 5724–5729, 1984.

MORAND, S.; AGNANDJI, D.; NOEL-HUDSON, M. S.; NICOLAS, V.; BUISSON, S.; MACON-LEMAITRE, L.; GNIDEHOU, S.; KANIEWSKI, J.; OHAYON, R.; VIRION, A.; DUPUY, C. Targeting of the dual oxidase 2 N-terminal region to the plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, 279, 30244–30251, 2004.

MOTTA, F. N.; BASTOS, I. M.; FAUDRY, E.; EBEL, C.; LIMA, M. M.; NEVES, D.; RAGNO, M.; BARBOSA, J. A.; DE FREITAS, S. M.; SANTANA, J. M. The *Trypanosoma cruzi* virulence factor oligopeptidase B (OPBTc) assembles into an active and stable dimer. **PloS one**, 7(1), e30431, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030431>.

MOURA, V. F. **Clonagem, expressão heteróloga e citolocalização da metionina aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi***. [Dissertação]. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília, 2011.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptídomiméticos. **Química Nova**, 37(2), 308–316, 2014.

NAME, J. V. F. Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: Interferência pós-transcricional na expressão da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano. [Tese]. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília, 2022.

NOMOTO, S.; HISHIDA, M.; INOKAWA, Y.; TAKANO, N.; KANDA, M.; NISHIKAWA, Y.; FUJII, T.; KOIKE, M.; SUGIMOTO, H.; KODERA, Y. Expression analysis of THOP1 in background liver, a prognostic predictive factor in hepatocellular carcinoma, extracted by multiarray analysis. **Ann Surg Oncol.**, 21(3), 443-450, 2014. doi:10.1245/s10434-014-3581-1

OLIVEIRA, V.; CAMPOS, M.; MELO, R. L.; FERRO, E. S.; CAMARGO, A. C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligopeptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. **Biochemistry**, 40(14), 4417-4425, 2001. doi:10.1021/bi002715k

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, T. G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **Eur J Biochem.**, 135(1), 81-88, 1983. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07620.x.

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; MOLINEAUX, C.J. Substrate- related potent inhibitors of brain metalloendopeptidase. **Biochemistry**, 27, 597-602, 1988.

ORLOWSKI, M.; REZNIK, S.; AYALA, J.; PIEROTTI, A. R. Endopeptidase 24.15 from rat testes. Isolation of the enzyme and its specificity toward synthetic and natural peptides, including enkephalin-containing peptides. **The Biochemical journal**, 261(3), 951–958, 1989. <https://doi.org/10.1042/bj2610951>.

PAYSAN-LAFOSSÉ T; BLUM M; CHUGURANSKY S; GREGO T; PINTO BL; SALAZAR GA; BILESCHI ML, BORK P, BRIDGE A, COLWELL L, GOUGH J, HAFT DH, LETUNIĆ I, MARCHLER-BAUER A, MI H, NATALE DA, ORENGO CA, PANDURANGAN AP, RIVOIRE C, SIGRIST CJA, SILLITOE I, THANKI N, THOMAS PD, TOSATTO SCE, WU CH, BATEMAN A. InterPro in 2022. **Nucleic Acids Research**, 51(1), 418–427, 2022. doi: 10.1093/nar/gkac993

PEREIRA, M. G.; SOUZA, L. L.; BECARI, C.; DUARTE, D. A.; CAMACHO, F. R.; OLIVEIRA, J. A.; GOMES, M. D.; OLIVEIRA, E. B.; SALGADO, M. C.; GARCIA-CAIRASCO, N.; COSTA-NETO, C. M. Angiotensin II-independent angiotensin-(1-7) formation in rat hippocampus: involvement of thimet oligopeptidase. **Hypertension**, 62(5), 879–885, 2013. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01613>

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, 391(10115), 82-94, 2017. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4. PMID: 28673423.

PERRAKIS, A.; SIXMA, T. K. AI revolutions in biology: The joys and perils of AlphaFold. **EMBO Rep.**, 22, 54046, 2021. doi:10.15252/embr.202154046

POLLIO, G.; HOOZEMANS, J. J.; ANDERSEN, C. A.; RONCARATI, R.; ROSI, M. C.; VAN HAASTERT, E. S.; SEREDENINA, T.; DIAMANTI, D.; GOTTA, S.; FIORENTINI, A.; MAGNONI, L.; RAGGIASCHI, R.; ROZEMULLER, A. J.; CASAMENTI, F.; CARICASOLE, A.; TERSTAPPEN, G. C. Increased expression of the oligopeptidase THOP1 is a neuroprotective response to Abeta toxicity. **Neurobiol Dis.**, 31(1), 145-158, 2008. doi:10.1016/j.nbd.2008.04.004.

PORTARO, F. C.; HAYASHI, M. A.; SILVA, C. L.; CAMARGO, A. C. Free ATP inhibits thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) activity, induces autophosphorylation in vitro, and controls oligopeptide degradation in macrophage. **Eur J Biochem.**, 268, 887–894, 2001.

QI, L.; LI, S. H.; SI, L. B.; LU, M.; TIAN, H. Expression of THOP1 and its relationship to prognosis in non-small cell lung cancer. **PloS one**, 9(9), 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106665>

QUEIROZ, R. M. L. **Proteômica de *Trypanosoma cruzi*: variações em subproteomas durante a amastigogênese**. [Tese]. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília, 2013.

QUEIROZ, R. M.; CHARNEAU, S.; MANDACARU, S. C.; SCHWÄMMLE, V.; LIMA, B. D.; ROEPSTORFF, P.; RICART, C. A. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. **Mol Cell Proteomics**, 13(12), 3457-3472, 2014. doi:10.1074/mcp.M114.040329

RAMOS, M. P. C. **AUMENTO DA ESTABILIDADE DA THIMET-OLIGOPEPTIDASE (EC 3.24.15) IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS DE OURO (THOP-GNP)**. [Dissertação]. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2023.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods Enzymol.**, 248, 183-228, 1995. doi: 10.1016/0076-6879(95)48015-3. PMID: 7674922.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J.**, 290(1), 205-218, 1993. doi: 10.1042/bj2900205. PMID: 8439290; PMCID: PMC1132403.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, 40, 343–350, 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr987>

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic acids research**, 46, 624–632, 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochem J**, 378(3):705-716, 2004. doi: 10.1042/BJ20031825. PMID: 14705960; PMCID: PMC1224039.

RAWLINGS, N.D.; WALLER, M.; BARRETT, A.J; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, 42, 503-509, 2014.

RAY K.; HINES, C. S.; RODGERS, D. W. Mapping sequence differences between thimet oligopeptidase and neurolysin implicates key residues in substrate recognition. **Protein Sci.**, 11(9):2237-46, 2002. doi: 10.1110/ps.0216302. PMID: 12192079; PMCID: PMC2373592.

RAY, K.; HINES, C. S.; COLL-RODRIGUEZ, J.; RODGERS, D. W. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. **J. Biol. Chem.**, 279(19), 20480-20489, 2004. doi: 10.1074/jbc.M400795200. PMID: 14998993.

REVA, B. A.; FINKELSTEIN, A. V.; SKOLNICK, J. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?. **Folding & design**, 3, 2, 141–147, 1998. [https://doi.org/10.1016/s1359-0278\(98\)00019-4](https://doi.org/10.1016/s1359-0278(98)00019-4)

ROCK, K. L.; YORK, I. A.; GOLDBERG, A. L. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. **Nat Immunol.**, 5, 670–677, 2004.

ROSENBERG, R. C; ROOT, C. A.; BERNSTEIN, P. K.; GRAY, H. B. Spectral studies of copper (II) carboxypeptidase A and related model complexes. **Journal of the American Chemical Society**, 97(8):2092–2096, 1975.

SAEIDNIA, S.; MANAYI, A.; ABDOLLAHI, M. The Pros and Cons of the In-silico Pharmacotoxicology in Drug Discovery and Development. **International Journal of Pharmacology**, 9, 176-181, 2013. 10.3923/ijp.2013.176.181.

SANDÉN, C.; ENQUIST, J.; BENGTSON, S. H.; HERWALD, H.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Kinin B2 receptor- mediated bradykinin internalization and metalloendopeptidase EP24.15-dependent intracellular bradykinin degradation. **J Pharmacol Exp Ther.**, 326(1), 24-32, 2008. doi:10.1124/jpet.108.136911

SARIC, T.; GRAEF, C. I.; GOLDBERG, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. **J. Biol. Chem.**, 279(45), 46723-46732, 2004.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 27(2), 157–162, 1967.

SEHN, E. Dinâmica da desnaturação térmica das proteínas do sangue e fotoestabilidade de formulações de uso tópicos: Estudo quantitativo com métodos fototérmicos. 2009. 123f. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

SERIZAWA, A.; DANDO, P. M.; BARRETT, A. J. Characterization of a mitochondrial metallopeptidase reveals neurolysin as a homologue of thimet oligopeptidase. **The Journal of biological chemistry**, 270(5), 2092–2098, 1995. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.2092>

SHRIMPTON, C. N.; ABBENANTE, G.; LEW, R. A.; SMITH, I. Development and characterization of novel potent and stable inhibitors of endopeptidase EC 3.4.24.15. **Biochem J.**, 345(2), 351-356, 2000.

SHRIMPSON, C. N.; GLUCKSMAN, M. J.; LEW, A. L.; TULLAI, J. W.; MARGULIES, E. H.; JAMES, L. R.; SMITH, A. L. Thiol activation of endopeptidase EC 3.4.24.15 a novel mechanism for the regulation of catalytic activity. **J Biol Chem.**, 272, 17395–17399, 1997.

SHRIMPSON, C. N.; SMITH, A. I.; LEW, R. A. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. **Endocrinol. Rev.**, 23, 647–664, 2002.

SIGMAN, J. A.; PATWA, T. H.; TABLANTE, A. V.; JOSEPH, C. D.; GLUCKSMAN, M. J.; WOLFSON, A. J. Flexibility in substrate recognition by thimet oligopeptidase as revealed by denaturation studies. **The Biochemical journal**, 388, 255–261, 2005.
<https://doi.org/10.1042/BJ20041481>.

SILVA JÚNIOR, E. N.; JARDIM, G. A. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25(10), 1780–1798, 2014. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140180>

SILVERMAN, J. M., CHAN, S. K., ROBINSON, D. P., DWYER, D. M., NANDAN, D., FOSTER, L. J., & REINER, N. E. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biol.**, 9(2), 35, 2008. doi:10.1186/gb-2008-9-2-r35

SIMÕES, M. V.; ROMANO, M. M. D.; SCHMIDT, A.; MARTINS, K. S. M.; MARINETTO, J. A. Cardiomiopatia da Doença de Chagas. **Int. J. Cardiovasc. Sci.**, 31(2):173-189, 2018. doi:10.5935/2359-4802.20180011

SLATER, O.; KONTOYIANNI, M. The compromise of virtual screening and its impact on drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, 14(7), 619–637, 2019.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1604677>

SMITH, A. I.; LEW, R. A.; SHRIMPSON, C. N.; EVANS, R. G.; ABBENANTE, G. A novel stable inhibitor of endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. **Hypertension**, 35(2), 626-630, 2000. doi:10.1161/01.hyp.35.2.626

SOL, V. **Workshop internacional sobre proteases de parasitos na Fiocruz**. Instituto Oswaldo Cruz, 2017. Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1890&sid=32>. Acesso em 08 jul. 2024.

SOUZA, C.; VIANA, Y.; ALVES, W.; PINHEIRO, E.; BELOTA, L.; JUNIOR, M.; ARAÚJO, C.; MELLO, K.; RESENDE, D.; ARAÚJO, P. The incidence of chagas disease before and during the COVID-19 pandemic: a cross-sectional analysis. **Health and Society**, 2, 89-103, 2022. 10.51249/hs.v2i03.1018.

SOUZA, D. L. N. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA METALOPROTEINASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*). 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SUN, M. A.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; XIA, Y.; GE, W.; GUO, D. Prediction of reversible disulfide based on features from local structural signatures. **BMC Genomics**, 18(1), 279, 2017. doi: 10.1186/s12864-017-3668-8. PMID: 28376774; PMCID: PMC5379614.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Mol Biol Evol.**, 38(7), 3022-3027, 2021. doi: 10.1093/molbev/msab120. PMID: 33892491; PMCID: PMC8233496.

TANG, P. W.; CHUA, P. S.; CHONG, S. K.; MOHAMAD, M. S.; CHOON, Y. W.; DERIS, S.; OMATU, S.; CORCHADO, J. M.; CHAN, W. H.; RAHIM, R. A. A Review of Gene Knockout Strategies for Microbial Cells. **Recent Pat. Biotechnol.**, 9(3):176-197, 2015. doi: 10.2174/1872208310666160517115047. PMID: 27185502.

TARNOW, P.; SCHONEBERG, T.; KRUDE, H.; GRUTERS, A.; BIEBERMANN, H. Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. **J. Biol. Chem.**, 278, 48666–48673, 2003.

TORRICO, F.; GASCÓN, J.; BARREIRA, F.; BLUM, B.; ALMEIDA, I. C.; ALONSO-VEGA, C.; BARBOZA, T.; BILBE, G.; CORREIA, E.; GARCIA, W.; ORTIZ, L.; PARRADO, R.; RAMIREZ, J. C.; RIBEIRO, I.; STRUB-WOURGAFT, N.; VAILLANT, M.; SOSA-ESTANI, S.; BENDITA STUDY GROUP. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial [published correction appears in *Lancet Infect Dis.* **Lancet Infect Dis.**, 21(8), 1129-1140, 2021. doi:10.1016/S1473-3099(20)30844-6

UKAI, Y.; LI, Q.; ITO, S.; MITA, S. A novel synthetic inhibitor of endopeptidase-24.15. **J Enzyme Inhib.**, 11(1), 39-49, 1996.

VALLEE B. L.; AULD, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. **Biochemistry**, 29(24):5647-59, 1990. doi: 10.1021/bi00476a001. PMID: 2200508.

VARADI, M., ANYANGO, S., DESHPANDE, M., NAIR, S., NATASSIA, C., YORDANOVA, G., YUAN, D., STROE, O., WOOD, G., LAYDON, A., ŽÍDEK, A., GREEN, T., TUNYASUVUNAKOOL, K., PETERSEN, S., JUMPER, J., CLANCY, E., GREEN, R., VORA, A., LUTFI, M., FIGURNOV, M., VELANKAR, S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, 50, 439-444, 2021.

VARADI, M.; BERTONI, D.; MAGANA, P.; PARAMVAL, U.; PIDRUCHNA, I.; RADHAKRISHNAN, M.; TSENKOV, M.; NAIR, S.; MIRDITA, M.; YEO, J.; KOVALEVSKIY, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; LAYDON, A.; ŽÍDEK, A.; TOMLINSON, H.; HARIHARAN, D.; ABRAHAMSON, J.; GREEN, T.; JUMPER, J.; BIRNEY, E., ... VELANKAR, S. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. **Nucleic acids research**, 52, 368–375, 2024. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>.

VARADI, M.; BORDIN, N.; ORENGO, C.; VELANKAR, S. The opportunities and challenges posed by the new generation of deep learning-based protein structure predictors. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 79, 102543, 2023.

WAGMANN, L.; GAMPFER T. M.; MEYER M. R. Recent trends in drugs of abuse metabolism studies for mass spectrometry-based analytical screening procedures. **Anal**

Bioanal Chem., 413(22), 5551-5559, 2021. doi: 10.1007/s00216-021-03311-w. PMID: 33792746.

WANG, J., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., GONZALES, N. R., GWADZ, M., LU, S., MARCHLER, G. H., SONG, J. S., THANKI, N., YAMASHITA, R. A., YANG, M., ZHANG, D., ZHENG, C., LANCZYCKI, C. J., & MARCHLER-BAUER, A. The conserved domain database in 2023. **Nucleic Acids Res**, 51(D1), 384–388, 2023.

WANG, W.; PENG, D.; BAPTISTA, R. P.; LI, Y.; KISSINGER, J. C.; TARLETON, R. L. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **PLoS pathogens**, 17, 1, e1009254, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009254>

WONG, F., KRISHNAN, A., ZHENG, E. J., STÄRK, H., MANSON, A. L., EARL, A. M., JAAKKOLA, T., & COLLINS, J. J. Benchmarking AlphaFold-enabled molecular docking predictions for antibiotic discovery. **Mol. Syst. Biol.**, 18, e11081, 2022. doi:10.15252/msb.202211081

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2. Acesso em 12 jun. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global distribution of Chagas disease, based on official estimates**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf>. Acesso em 12 jun. 2024.

YANG, Y.; YAO, K.; REPASKY, M. P.; LESWING, K.; ABEL, R.; SHOICHET, B. K.; JEROME, S. V. “Efficient exploration of chemical space with docking and deep learning”, **J. Chem. Theory Comput.**, 17(11), 7106–7119, 2021.

YORK, I. A.; MO, A. X.; LEMERISE, K.; ZENG, W.; SHEN, Y.; ABRAHAM, C. R.; SARIC, T.; GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. **Immunity**, 18(3), 429-440, 2003. doi:10.1016/s1074-7613(03)00058-x

YUSUF, M. Insights into the in-silico research: Current scenario, advantages, limits, and future perspectives. **Life in Silico**, 1(1), 13–25, 2023.